



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 9/10, 9/26, C12P 19/04, C12N 15/54, 15/56	A1	(11) 国際公開番号 WO95/34642 (43) 国際公開日 1995年12月21日(21.12.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP95/01189 (22) 国際出願日 1995年6月14日(14.06.95) (30) 優先権データ 特願平6/133354 1994年6月15日(15.06.94) JP 特願平6/194223 1994年8月18日(18.08.94) JP 特願平6/290394 1994年10月31日(31.10.94) JP 特願平6/286917 1994年11月21日(21.11.94) JP 特願平6/311185 1994年11月21日(21.11.94) JP 特願平7/120673 1995年4月21日(21.04.95) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 麒麟麦酒株式会社(KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒104 東京都中央区新川二丁目10番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者：および (75) 発明者／出願人 (米国についてののみ) 加藤 優(KATO, Masaru)[JP/JP] 三浦 裕(MIURA, Yutaka)[JP/JP] 決得麻佐子(KETTOKU, Masako)[JP/JP] 小林和男(KOBAYASHI, Kazuo)[JP/JP] 〒370-12 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社 応用開発センター内 Gunma, (JP)	岩松明彦(IWAMATSU, Akihiro)[JP/JP] 米田俊浩(KOMEDA, Toshihiro)[JP/JP] 〒236 神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟麦酒株式会社 基盤技術研究所内 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 佐藤一雄, 外(SATO, Kazuo et al.) 〒100 東京都千代田区丸の内三丁目2番3号 富士ビル323号 協和特許法律事務所 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, US, UZ, VN, 欧州特許(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許(KE, MW, SD, SZ, UG). 添付公開書類 国際調査報告書	
(54) Title : NOVEL TRANSFERASE AND AMYLASE, PROCESS FOR PRODUCING THE ENZYMES, USE THEREOF, AND GENE CODING FOR THE SAME		
(54) 発明の名称 新規トランスフェラーゼ及びアミラーゼ、それらの製造法及び利用、並びに該新規酵素類の遺伝子		
(57) Abstract <p>The invention provides a novel transferase that acts on a saccharide, as a substrate, composed of at least three sugar units wherein at least three glucose residues on the reducing end side are linked α-1,4 so as to transfer the α-1,4 linkages to a α-1, α-1 linkages; a process for producing the transferase; a gene coding for the same; and a process for producing an oligosaccharide by using the same. Also provided are a novel amylase that has a principal activity of acting on a saccharide, as a substrate, composed of at least three sugar units wherein at least three glucose units on the reducing end side are glucose units and the linkage between the first and the second glucose units is α-1, α-1 while the linkage between the second and the third glucose units is α-1,4 so as to liberate α, α-trehalose by hydrolyzing the α-1,4 linkage and another activity of hydrolyzing the α-1,4 linkage within the molecular chain of the substrate and that liberates dissaccharides and/or monosaccharides as the principal final products; a process for producing the amylase; a gene coding for the same; and a process for producing α, α-trehalose by using a combination of the transferase and the amylase.</p>	<p>反応前 a 20.11 21.712 マルトトリオース b 反応後 10.25 グルコース d 16.63, 17.45 マルトース e 20.11 マルトトリオース d 22.52 グルコシルトレハロース f</p> <p>a: Before reaction c: After reaction b: maltotriose d: glucose e: maltose f: glucosyltrehalose</p>	

(57) 要約

少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が $\alpha-1, 4$ 結合である3糖以上の糖を基質とし、その還元末端の $\alpha-1, 4$ 結合を $\alpha-1, \alpha-1$ 結合に転移させる作用を有する新規トランスフェラーゼ、その製造法、その遺伝子、及びそれを用いたオリゴ糖の製造法が開示されている。

また、少なくとも還元末端側の3糖がグルコース単位で構成され、該末端側の1つ目と2つ目のグルコース間の結合が $\alpha-1, \alpha-1$ 結合で、該末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の結合が $\alpha-1, 4$ 結合である3糖以上の糖を基質とし、2つ目と3つ目のグルコース間の $\alpha-1, 4$ 結合を加水分解し、 α, α -トレハロースを遊離する主要な活性とともに、基質の分子鎖中の $\alpha-1, 4$ 結合をエンド型で加水分解する活性を合わせ持ち、最終主生成物として2糖及び／又は単糖を遊離する新規アミラーゼ、その製造法、その遺伝子、及びそれを上記新規トランスフェラーゼと組み合わせて用いた α, α -トレハロースの製造法が開示されている。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DK	デンマーク	LK	スリランカ	PT	ポルトガル
AM	アルメニア	EE	エストニア	LR	リベリア	RO	ルーマニア
AT	オーストリア	ES	スペイン	LS	レソト	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FR	フランス	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バハマ	GB	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ギニア	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BG	ブルガリア	GG	ギニアビサウ	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MK	マケドニア共和国	TD	チャド
CC	中東	IE	アイルランド	ML	マリ	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	JP	日本	MR	モーリタニア	TR	トルコ
CH	スイス	KE	ケニア	MW	マラウイ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コートジボワール	KG	キルギスタン	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KR	朝鮮民主主義人民共和国	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CN	中国	KZ	カザフスタン	NL	オランダ	US	米国
CO	コロンビア	LI	リヒテンシュタイン	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン共和国
DE	ドイツ			NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム

明 細 書

新規トランスフェラーゼ及びアミラーゼ、それらの製造法及び利用、並びに該新規酵素類の遺伝子

技 術 分 野

本発明は、I - 新規トランスフェラーゼ、その製造法及び該酵素を用いたオリゴ糖の製造法、並びに該酵素の遺伝子及びその利用、II - 新規アミラーゼ、その製造法及び該酵素を用いた α 、 α -トレハロースの製造法、並びに該酵素の遺伝子及びその利用に関するものである。

より詳しくは、

I - 本発明は、少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が α -1, 4結合である3糖以上の糖を基質として、その還元末端の α -1, 4結合を α -1, α -1結合に転移させる作用を有する新規トランスフェラーゼとその製造法に関し、詳しくは、

Sulfolobales 目の古細菌、例えば Sulfolobus 属、Acidianus 属等の細菌の産生する上記酵素に関するものである。

また、本発明は、上記の新規酵素を用いたトレハロースオリゴ糖等の新規な製造法に関し、更に詳しくは、原料としてマルトオリゴ糖等を用いた効率的で、かつ高収率な、例えば、グルコシルトレハロース及びマルトオリ

ゴシルトレハロースなどのトレハロースオリゴ糖の製造法に関する。

また、本発明は上記の新規トランスフェラーゼをコードするDNA断片及びこのDNA断片の遺伝子工学的な利用に関する。

II- 本発明は、少なくとも還元末端から3つ以上の糖がグルコース単位で構成される3糖以上の糖を基質とし、還元末端から加水分解して主に単糖及び／又は2糖を遊離する活性を有する新規アミラーゼとその製造法に関する。詳しくは、本発明は、少なくとも還元末端側の3糖がグルコース単位で構成され、該末端側の1つ目と2つ目のグルコース間の結合が $\alpha-1$, $\alpha-1$ 結合で、該末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の結合が $\alpha-1$, 4結合である3糖以上の糖を基質とし、2つ目と3つ目のグルコース間の $\alpha-1$, 4結合を加水分解し、 α , α -トレハロースを遊離する主要な活性を有する新規アミラーゼ及びその製造法に関する。該酵素は更に基質の分子鎖中の $\alpha-1$, 4結合をエンド型で加水分解する活性を合わせて有する新規なアミラーゼであって、Sulfolobus属に属する細菌によって産生される新規な酵素である。本酵素はデンプン糖工業、繊維工業、食品工業等の産業において有用である。

また、本発明は、上記新規アミラーゼと、上記新規トランスフェラーゼとを組み合わせることを特

徴とする α ， α -トレハロースの製造法に関する。詳しくは、デンプン、デンプン分解物、或いはマルトオリゴ糖各単独又はマルトオリゴ糖の混合物を原料として用い、また酵素として本発明の新規トランスフェラーゼとアミラーゼとを用いて高収率で α ， α -トレハロースを製造する方法に関する。

また、本発明は上記の新規アミラーゼをコードするDNA断片及びこのDNA断片の遺伝子工学的な利用に関する。

背景技術

I. 酵素トランスフェラーゼの背景技術

デンプン、及びマルトオリゴ糖等のデンプン分解物に作用する糖転移酵素については、今までに様々なグルコシルトランスフェラーゼ、及びサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ（CGTase）などが見出されている（生物化学実験法25、澱粉・関連糖質酵素実験法、学会出版センター刊、及びBIOINDUSTRY, Vol. 9, No. 1 (1992) 39-44など参照）。これらの酵素はグルコシル基を α -1, 2、 α -1, 3、 α -1, 4、 α -1, 6位に転移する酵素であるが、 α -1, α -1位に転移するような酵素は未だに知られていない。 α -1, α -1結合に作用する酵素としては、トレハロース分解酵素であるトレハラーゼがあるが、あくまでトレハロースを唯一の基質とする分

解酵素であり、その平衡及び反応速度は分解反応側に偏っている。

ところで近年、オリゴ糖には保湿性、保形性、粘性、褐変防止等の理化学的特性、及び低カロリー性、抗う食性、ビフィズス活性等の生理活性があることが見出されており、それに伴いマルトオリゴ糖、分岐オリゴ糖、フラクトオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、キシロオリゴ糖等のオリゴ糖が開発されてきた（甘味料（1989年版）メディカルリサーチ社刊、月刊フードケミカル（1993年2月号）21-29など参照）。

オリゴ糖のうち、還元末端の存在しないオリゴ糖に関しては、還元性を持たないショ糖を骨格とした、フラクトシルトランスフェラーゼにより生産されるフラクトオリゴ糖等がある。またマルトオリゴ糖等のデンプン分解物で、還元末端を持たないオリゴ糖としては、前記CGTaseにより生産されるサイクロデキストリン、 α 、 β -トレハロース（ネオトレハロース）、及び化学合成により還元末端に水素添加したオリゴ糖還元物（オリゴ糖アルコール）等がある。これらの還元末端の存在しないオリゴ糖には、従来の水飴、マルトオリゴ糖にはない、様々な理化学的特性及び生理活性がある。よって、マルトオリゴ糖においてその還元末端側が $\alpha-1$ 、 $\alpha-1$ 結合を有しているオリゴ糖についてもこのオリゴ糖が還元末端を有さないことから、上記の還元末端を有

さないオリゴ糖が持つような物理化学的特性及び生理活性を有することが期待されうる。

ところで、上記したような還元末端側が α -1, α -1 結合を有しているマルトオリゴ糖は、 α , α -トレハロースにグルコース又はマルトオリゴ糖が結合したトレハロースオリゴ糖であると考えることができる。よって、このようなトレハロースオリゴ糖は、還元末端を有さないオリゴ糖が有する物理化学特性及び生理活性に加えて、更に α , α -トレハロースに見られる様な特徴的な活性（例えば、特表昭 63-500562 号参照）も有することが期待されうる。

トレハロースオリゴ糖に関しては、自然界では酵母内に痕跡量認められるという報告（*Bio sci. Biotech. Biochem.*, 57 (7), 1220-1221 (1993)）があるがこれのみであり、また酵素による合成も報告（1994 年度日本農芸化学大会、講演要旨集、247）されてはいるが、その方法は原料として高価なトレハロースを用いるものであり、安価な供給は期待できていないのが現状である。

ところで、*Lama* らは古細菌の一種である *Sulfolobus solfataricus* strain MT-4 株（DSM 5833 株）の菌体抽出液中に耐熱性のデンプン分解活性があることを見出している（*Biotech. Forum. Eur.* 8,

4, 2-1 (1991))。彼らは更に、この活性は、デンプンからトレハロース及びグルコースを生成する活性であるとも報告している。しかしながら上記の報告にはグルコシルトレハロース、マルトオリゴシルトレハロース等のトレハロースオリゴ糖の存在については全く触れられていない。更に上記の菌株以外の古細菌についての検討も全くなされてない。

また、トレハロースオリゴ糖の効率のよい生産のためには、この新規トランスフェラーゼの効率のよい入手法の確立が必要であるといえる。

従って、トレハロースオリゴ糖の大量生産のためには、この新規トランスフェラーゼの更なる大量取得が望まれる。そのためには、これら酵素の遺伝子を取得し、遺伝子工学的にそれを生産することが好ましい。さらに、遺伝子を取得出来れば、蛋白工学の技術を用いて、耐熱性、耐pH性の向上、反応速度が増大された酵素を得ることも期待出来る。しかしながら、このような酵素についての遺伝子クローニングに関する報告は未だなされていない。

本発明は、マルトオリゴ糖等の糖から、代表的にはグルコシルトレハロース及びマルトオリゴシルトレハロース等のトレハロースオリゴ糖を生成する反応の触媒作用を有する新規なトランスフェラーゼと、その製造法、並びに該酵素を用いてマルトオリゴ糖等の原料から効率的、

かつ高収率で、代表的には、グルコシルトレハロース、マルトオリゴシルトレハロース等のトレハロースオリゴ糖を製造する新規な方法を提供することを目的とする。

本発明者らは、古細菌のトレハロース生成活性について鋭意検討した結果、S u l f o l o b a l e s 目に属し、詳しくはS u l f o l o b u s 属、A c i d i a n u s 属等に属する広い範囲の古細菌の菌体抽出液が、マルトトリオースを基質としてグルコシルトレハロースを生成することを見出した。この際、デンプンを基質としたL a m a らによる活性測定法ではトレハロースとグルコースの生成は確認されたものの、グルコシルトレハロースなどのトレハロースオリゴ糖の生成の確認は非常に困難であることがわかった。また、古細菌の菌体抽出液の精製過程においてL a m a らが見出したトレハロースの生成活性は消失されてしまうことも知見し、総じてこのような活性を有する酵素自体の精製及び特定化は実質上不可能であることがわかった。

このような状況下にあって本発明者らは更に研究を重ね、マルトオリゴ糖（例えばマルトトリオース）を基質とし、トレハロースオリゴ糖（例えばグルコシルトレハロース）を生成する活性を指標とする新しい活性測定法を思考するに至り、この測定法を実施したところトレハロースオリゴ糖（例えばグルコシルトレハロース）の検出が容易に可能であることを見出し、更に種々の菌株に

関してこの活性を有する酵素の精製を試みたところ、驚くべきことにこうして得られた酵素は、還元末端から3つ以上のグルコース残基が $\alpha-1, 4$ 結合であるマルトリオース以上の糖に作用して還元末端のグルコース残基を $\alpha-1, \alpha-1$ に転移させ、グルコシルトレハロースなどのトレハロースオリゴ糖を生産する能力を有する全く新規なトランスフェラーゼであることを知見した。なお、マルトオリゴ糖等の還元末端のグルコース残基が $\alpha-1, \alpha-1$ に転移したトレハロースオリゴ糖の存在は $^1\text{H-NMR}$ 及び $^{13}\text{C-NMR}$ により確認した（実施例I-1、7及び8参照）。

本発明者らは、更に、このような新規酵素を用いることによりマルトオリゴ糖等の糖から、大量に、例えば、グルコシルトレハロース及びマルトオリゴシルトレハロース等のトレハロースオリゴ糖を生産することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

本発明者らは、更に、このような新規酵素の遺伝子を単離し、この遺伝子を利用して組換え新規トランスフェラーゼを遺伝子工学的に生産する手法を、今般、確立した。

II. 酵素アミラーゼの背景技術

アミラーゼはデンプンを加水分解する酵素の総称であり、その中で α -アミラーゼは $\alpha-1, 4$ グルコシド結合をエンド様式で加水分解する活性を持つ酵素である。 α -アミラーゼは生物界に広く存在し、ほ乳類において

は、消化酵素として、唾液、膵液中に認められる。植物においては、麦芽等に多く認められる。また微生物界においても広く分布しており、特に

Aspergillus 属に属するかび、

Bacillus 属に属する細菌の産生する α -アミラーゼ等が産業上使用されている（アミラーゼ、中村道徳監修、学会出版センター刊、1986年）。

これらの α -アミラーゼは産業上様々な用途で使用されており、例えば、デンプン糖工業においてはデンプンの液化工程で、また繊維工業では糊抜き工程等で広く用いられており、工業的に大変重要な酵素である。「酵素応用の知識」（小巻利章、幸書房刊、1986年）によれば、デンプンの液化工程で重要なこととして、1）デンプン分子をできるだけ完全に溶かすこと、2）液化生成物が次の糖化工程の目的に対して好都合であること、3）液化生成物が老化しない条件であること、4）経済的見地からできるだけ高濃度（30～35%）で実施することなどが挙げられている。デンプンの液化工程は例えば、連続恒温液化法、ジェットクッカー法などで実施され、通常 α -アミラーゼ含有の、高濃度デンプン乳液を瞬間的に高温（85～110℃前後）にまで上げ、デンプンが糊化、膨潤しはじめると同時に、 α -アミラーゼを作用させて液化している。すなわち、デンプンの液化工程では酵素が作用できるようにデンプンを膨潤させ

るだけの十分な温度を必要としている。このような分野で使用する酵素としては、例えば、上述の *Aspergillus* 属に属する麹菌や *Bacillus* 属に属する細菌の産生する耐熱性 α -アミラーゼが挙げられる。これらの酵素の耐熱性を更に向上させるために、カルシウムを添加する必要がある場合もある。もしデンプンの液化工程で膨潤し、開裂しかけたデンプンミセルが α -アミラーゼの作用を受けずに、ひとたび温度が低下すると、デンプンは再び集まり、 α -アミラーゼで液化されにくい新しいミセル（難溶性デンプン）を作ってしまう。その結果、生じた糖液は混濁し、難濾過性となるという問題が知られている。このような事態を防止するために、液化度（DE = Dextrose Equivalent）をある程度高める方法がとられている。しかし酵素法マルトースの製造工程のように、収率を高く維持するためになるべくこの DE を低く（すなわち糖鎖の重合度を高く）保つ必要がある場合もある。従って、デンプンの液化工程後、次工程で酵素を更に作用させる場合、高温を維持したまま作用させうる耐熱性酵素を用いるならば、デンプン濃度が高い場合でも、これを用いて難溶性デンプンを生成させることなく反応を進めることが可能であり、また同時に、微生物汚染の危険も低減させうるために工程管理、衛生管理の面からも有利であるといえる。また、酵素を反復使用するために、固定化

してバイオリアクターとして利用する場合には、酵素が高い安定性、特に耐熱性を有することが重要であるといわれている。すなわち、固定化のために比較的高温にさらされることがあるが、耐熱性が低いものでは固定化操作中に失活してしまう恐れがあるからである。以上のことから耐熱性の高い酵素は、例えばデンプンの液化工程などの場合を含め各種の産業において非常に有利に用いることができ、かつ、望まれていると言えよう。

また、近年アミラーゼを含み耐熱性酵素の取得に関しては好熱性、高度好熱性細菌のスクリーニングが広く行われている。その中には *Thermococcales* 目、*Pyrococcus* 属に属する古細菌も対象となっており、 α -アミラーゼを産生するとの報告がある

(*Applied and Environmental Microbiology*, 1985 - 1991 (1990) ; 特開平6-62869など)。
また *Sulfolobus* 属に属する古細菌もその対象になっており、耐熱性酵素の単離が報告されている。ここにおいて、*Sulfolobus* 属に属する古細菌とは、分類学上、高度高熱性（温度：55℃～88℃の範囲で生育）、好酸性（pH：1～6の範囲で生育）、好気性、硫黄細菌（球菌（不規則）：直径0.6～2 μ m）として定義される古細菌をいう。よって、*Sulfolobus* 属に属する古細菌がアミラーゼを産生しうるならばこのアミラーゼも耐熱性を有すること

が期待される。L a m a らは古細菌の一種である
S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
s t r a i n M T - 4 株 (D S M 5 8 3 3 株) の菌
体抽出液に耐熱性のデンプン分解活性があることを見出
している (B i o t e c h . F o r u m . E u r . 8 ,
4 , 2 - 1 (1 9 9 1)) 。この文献ではこの活性は、デ
ンプンから α , α - トレハロース及びグルコースを生成
する活性であると報告している。しかしながらこの活性
物質については部分精製しかしておらず、活性本体につ
いての特定はしていない。また活性の酵素学的諸性質に
ついては全く解明していない。本発明者らの研究によれ
ば (詳細は後述する) 、L a m a らがデンプンに作用さ
せた上記菌株由来の活性物質は複数の酵素の混合体であ
り、これを用いて得られた最終生成物が α , α - トレハ
ロースとグルコースであったのである。

ところで、 α - アミラーゼには初期にヨウ素デンプン
反応を減少させるという、すなわち、 α - 1 , 4 グルカ
ンをエンド型に加水分解する活性 (液化活性) がある。
この液化型アミラーゼにも反応機構上様々な様式がある。
すなわち、エンド型で加水分解する活性としては共通し
ているが、マルトオリゴ糖の分解パターンについて調べ
てみると、それぞれ特徴があることが知られている。例
えば、非還元末端側から特定の位置を認識して加水分解
するもの、還元末端側から特定の位置を認識して加水分

解するものがあり、また、分解された主生成物がグルコースであるもの、或いはマルトース又はマルトオリゴ糖であるものなどがある。具体的には、すい臓由来の α -アミラーゼは還元末端から2つ目、或いは3つ目の α -1, 4結合を加水分解する（澱粉・関連糖質酵素実験法、中村道徳・貝沼圭二、学会出版センター刊、1989年）。また、枯草菌由来の α -アミラーゼは非還元末端から6つ目あるいは還元末端から3つ目の α -1, 4結合を加水分解する（酵素応用の知識、小巻利章、幸書房刊、1986年）。このような α -アミラーゼの反応様式の差異は、各酵素の構造に起因するといわれており、これらの現象の解釈についてはサブサイト理論が提唱されている。また転移活性、縮合活性を持つものや、更にはサイクロデキストリンを生成するような特殊な α -アミラーゼも存在することが認められている。

一方、 α , α -トレハロースは、2分子のグルコースがその還元性基どうしで α -1, α -1結合したものであり、自然界の多くの生物、植物、微生物に存在し、生体膜の凍結や乾燥からの細胞保護や、昆虫のエネルギー源等、多くの働きを持つことが知られている。近年、この α , α -トレハロースはタンパク質の凍結や乾燥に対する安定化剤として、医薬品、化粧品、食品等の分野で検討されている（特公平5-81232、特開昭63-500562など）。しかしながら現在までのところ安

価な大量生産法が確立していないためか、実際に利用されている例はほとんどない。

従来の α , α -トレハロースの製造法としては、例えば、酵母抽出による方法（特開平 5-91890、特開平 4-360692 など）、酵母による菌体内生産による方法（特開平 5-292986、ヨーロッパ特許 0451896 など）、スクレロチウム

（*Sclerotium*）属、或いはリゾクトニア（*Rhizoctonia*）属に属する微生物による生産法（特開平 3-130084）等が試みられている。ただし、これらの方法では菌体内生産であるために、菌体破碎、夾雑物の除去の為の多段階の精製工程を必要としている。また、アルスロバクター

（*Arthrobacter*）属に属する微生物（*Agric. Biol. Chem.*, 33, No. 2, 190, 1969, Suzuki T, et al）、ノカルディア（*Nocardia*）属に属する微生物（特開昭 50-154485）、グルタミン酸生産菌（フランス特許 2671099、特開平 5-211882 など）を用いた発酵法による菌体外生産の検討もなされている。更にまた、 α , α -トレハロースの生合成酵素遺伝子による生産の検討も試みられている（PCT特許 93-17093）。これらの方法はいずれもグルコース等の糖源を用い、かつ ATP、UTP をエネルギー

として必要とする代謝系を利用するものである。よって、培養液からの α , α -トレハロースの繁雑な精製工程を必要としている。また更に、トレハロースホスホリラーゼを用いた方法（特公昭63-60998）、トレハラゼを用いた方法（特開平7-51063）等の酵素法による生産の検討も試みられているが、酵素の大量生産、酵素の安定性等の問題がある。以上のような従来の方法はいずれも低収量、精製工程の煩雑さ、低生産量、酵素調製の煩雑さ等の問題があり、未だに工業化しうる方法は確立されておらず、よって、より効率の良い α , α -トレハロースの製造法の確立が強く望まれているのが現状である。

α , α -トレハロースは上述のように自然界に広く見出され、古細菌にもその存在が確認されている

(System. Appl. Microbiol. 10, 215. 1988)。具体的には、前述したように、

Lamaらは古細菌の一種である

Sulfolobus solfataricus

strain MT-4株(DSM 5833株)の菌体抽出液に耐熱性のデンプン分解活性があることを見出しており、その生成物中に α , α -トレハロースの存在を確認している（前掲Biotech. Forum. Eur. 8, 4, 2-1(1991)）。この文献ではこの活性はデンプンから α , α -トレハロース及びグル

コースを生成する活性であると報告はしていても、実際には 0.33% 可溶性デンプンを基質とした場合の例を挙げているのみで、その際生成した α , α -トレハロースの量は極僅かなものであり、しかも α , α -トレハロース : グルコースの生成比は 1 : 2 であった。従って大量のグルコースを副生するためにその分離を必要とし、 α , α -トレハロースの大量生産法としての目的を達成しうるものでは全くなかったのである。

本発明者等は、前述したように、

Sulfolobales 目に属する古細菌が、少なくとも還元末端から 3 つ以上のグルコース残基が α -1, 4 結合である 3 糖以上の糖を基質とし、その還元末端の α -1, 4 結合を α -1, α -1 結合に転移させる作用を有するトランスフェラーゼを産生することを見出し、更にこの酵素を用いた、マルトオリゴ糖からのグルコシルトレハロース、マルトオリゴシルトレハロースなどのトレハロースオリゴ糖の製造法を発明した。なお、トレハロースオリゴ糖とは、還元末端側に α -1, α -1 結合を有しているマルトオリゴ糖をいう。

また一方、従来知られている各種酵素のうちで、マルトオリゴ糖の還元末端が α -1, α -1 結合となったトレハロースオリゴ糖を、その α -1, α -1 結合のとなりの α -1, 4 結合の位置で特異的に加水分解して収率よく α , α -トレハロースを遊離する作用を有する酵素

に関しては、本発明者らの知る限りでは、そのような報告は全くない。すなわち、トレハロースオリゴ糖の還元末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の $\alpha-1, 4$ 結合を特異的に加水分解して α, α -トレハロースを遊離することは従来のアミラーゼでは不可能であった。よって、デンプン又はデンプン分解物分子鎖中の $\alpha-1, 4$ 結合を加水分解する活性を有すると共に、上記したような α, α -トレハロース生成反応を触媒しうるアミラーゼを開発し得たならば、 α, α -トレハロースの大量生産上益することは多大であろう。

また、 α, α -トレハロースの大量生産のためには、この新規アミラーゼの大量取得が望まれる。そのためには、これら酵素の遺伝子を取得し、遺伝子工学的にそれを生産することが好ましい。さらに、遺伝子を取得出来れば、蛋白工学の技術を用いて、耐熱性、耐pH性の向上、反応速度が増大された酵素を得ることも期待出来る。

本発明は、デンプン又はデンプン分解物分子鎖中の $\alpha-1, 4$ 結合をエンド型で加水分解する活性を有すると共に、マルトオリゴ糖の還元末端が $\alpha-1, \alpha-1$ 結合となったトレハロースオリゴ糖の還元末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の $\alpha-1, 4$ 結合を特異的に加水分解して α, α -トレハロースを遊離する反応を触媒しうる新規なアミラーゼを提供すること、及び該酵素を製造する方法を提供すること、並びに該酵素を用いてデンプン

ブン、デンプン分解物、或いはマルトオリゴ糖等の安価な原料から効果的、かつ高収率で、 α , α -トレハロースを製造する新規な方法を提供することを目的とする。

本発明者らは古細菌のデンプン分解活性について鋭意検討した結果、*Sulfolobales*目に属し、詳しくは*Sulfolobus*属に属する広い範囲の古細菌の菌体抽出液が、耐熱性のデンプン分解活性を有することを見出した。その際デンプンの分解によって生成する糖は、*Lama*らの文献記載におけるのと同様に、主にグルコースと α , α -トレハロースであることを確認した。そこで、更に種々の菌株抽出液についてデンプン分解活性の性質を調べてみたところ、これらの菌株が産生する酵素が、デンプン分解活性や α , α -トレハロース生成活性などの酵素活性の点から液化アミラーゼ、グルコアミラーゼ等のエンド型、エキソ型の各種アミラーゼ、及びトランスフェラーゼなどにより構成されている酵素混合体であることを発見した。しかもその酵素活性は、これらの複数の酵素による活性の相乗作用によるものであることがわかった。更に、個々の酵素を精製しようとした場合、ヨウ素デンプン反応による青色の減少を指標とした*Lama*らによる活性測定法では感度および定量性が低いためか、総じてこのような酵素活性を有する酵素の精製は収率の点で低く、しかも操作が非常に困難であることがわかった。また本発明者らの詳細な検討に

よれば、L a m a らの文献記載の部分精製方法では、蛋白質レベルでは全く精製、単離がなされていないことがわかった。

このような状況下において本発明者らは更に研究を重ね、トレハロースオリゴ糖（例えばマルトリオシルトレハロース）を基質とし、 α , α -トレハロースを遊離する活性を指標とする新しい活性測定法を思考するに至り、この測定法を実施したところ、アミラーゼ活性の検出が容易に可能であることを見出し、更に種々の菌株に関してこの活性を有する酵素の精製を試みたところ、最終的にアミラーゼの単離精製に成功するに至った。また、単離精製されたアミラーゼに関して酵素学的な諸性質を調べてみたところ、驚くべきことにこうして得られた酵素は、デンプンまたはデンプン分解物をエンド型で加水分解する活性を有する他に、デンプン分解物またはマルトリオリゴ糖などを還元末端側から加水分解して単糖及び／又は2糖を生成する活性を有し、特に還元末端側の1つ目と2つ目のグルコース間の結合が α -1, α -1結合で、該末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の結合が α -1, 4結合である3糖以上の糖（例えばトレハロースオリゴ糖）との反応性が、それぞれ対応するマルトリオリゴ糖と比較して高く、このような3糖以上の糖を基質とし、還元末端側から2つ目と3つ目のグルコース間の α -1, 4結合を加水分解して α , α -トレハロース

を遊離する活性を合わせて有するという、全く新規な作用機作を有する酵素であることを知見した。

本発明者らは、更に、このような新規酵素の遺伝子を単離し、この遺伝子を利用して組換え新規アミラーゼを遺伝子工学的に生産する手法を、今般、確立した。

発 明 の 開 示

I. 新規トランスフェラーゼ

本発明は、少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が $\alpha-1, 4$ 結合である3糖以上の糖を基質とし、その還元末端の $\alpha-1, 4$ 結合を $\alpha-1, \alpha-1$ 結合に転移させる作用を有する新規トランスフェラーゼ

(以下、本発明の新規トランスフェラーゼ、或いは単に本発明の酵素又は本酵素とも称する)を提供するものである。

本発明は、また、他面において、すべてのグルコース残基が $\alpha-1, 4$ 結合であるマルトオリゴ糖を基質とし、その還元末端の $\alpha-1, 4$ 結合を $\alpha-1, \alpha-1$ 結合に転移させる作用を有する新規トランスフェラーゼを提供するものである。

本発明は、更に、このような作用をするトランスフェラーゼ産生能を有する細菌を培地に培養し、培養物より、マルトオリゴ糖を基質としトレハロースオリゴ糖を生成する活性を指標とする活性測定法に基づいて、該トランスフェラーゼを単離精製することを特徴とする本発明の

新規トランスフェラーゼの製造法を提供するものである。

本発明は、更にまた、本発明の酵素を用い、少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が $\alpha - 1, 4$ 結合である3糖以上の糖を基質として作用させ、少なくとも還元末端側の3糖がグルコース単位で構成され、該末端側の1つ目と2つ目のグルコース間の結合が $\alpha - 1, \alpha - 1$ 結合で、該末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の結合が $\alpha - 1, 4$ 結合である糖を製造することを特徴とする末端の2糖が $\alpha - 1, \alpha - 1$ 結合である糖の製造法を提供するものである。

本発明はまた更に、本発明の酵素を用い、マルトオリゴ糖各単独又はそれらの混合物を基質として作用させることを特徴とするトレハロースオリゴ糖の製造法を提供するものである。

また、本発明は新規トランスフェラーゼ遺伝子の提供をその目的としている。

また、本発明は前記遺伝子を用いた組換え新規トランスフェラーゼおよびその製造法の提供を目的としている。

さらに本発明は、組換え新規トランスフェラーゼを用いた効率的なグルコシルトレハロース、マルトグルコシルトレハロースなどのトレハロースオリゴ糖の製造法の提供をその目的としている。

よって、本発明によるDNA断片は、少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が $\alpha - 1, 4$ 結合で

ある三糖以上の糖を基質とし、その還元末端の $\alpha - 1, 4$ 結合を $\alpha - 1, \alpha - 1$ 結合に転移させる作用を有する新規トランスフェラーゼをコードする遺伝子を含んでなるもの、である。

また、本発明による組換え新規トランスフェラーゼは、上記 DNA 断片の発現産物である。

さらに、本発明による組換え新規トランスフェラーゼの製造法は、

前記遺伝子で形質転換された宿主細胞を培養し、その培養物中に前記組換え新規トランスフェラーゼを生成させ、これを採取することを含んでなるもの、である。

II. 新規アミラーゼ

本発明は、少なくとも還元末端から3つ以上の糖がグルコース単位で構成される3糖以上の糖を基質とし、還元末端側から加水分解して主に単糖及び／又は2糖を遊離する活性を有する新規アミラーゼを提供するものである。

また、本発明は、他面において、少なくとも還元末端側の3糖がグルコース単位で構成され、該末端側の1つ目と2つ目のグルコース間の結合が $\alpha - 1, \alpha - 1$ 結合で、該末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の結合が $\alpha - 1, 4$ 結合である3糖以上の糖を基質とし、2つ目と3つ目のグルコース間の $\alpha - 1, 4$ 結合を加水分解し、 α, α -トレハロースを遊離する主要な活性を有する新

規アミラーゼを提供するものである。

また、更に、本発明は、別の面において、上記したような活性を有すると共に、基質の分子鎖中の α -1, 4結合をエンド型で加水分解する活性を合わせ有する新規アミラーゼを提供するものである。

本発明は、更に、上記したような本発明のアミラーゼを産生する能力を有する細菌を培地に培養し、培養物より、トレハロースオリゴ糖を基質として α , α -トレハロースを生成する活性を指標とする活性測定法に基づいて、該アミラーゼを単離精製することを特徴とする該アミラーゼの製造法を提供するものである。

本発明者らは、上記したような本発明のアミラーゼと、前述した本発明のトランスフェラーゼとを、デンプン、デンプン分解物、及びマルトオリゴ糖等の糖質原料に組み合わせて作用させたところ効率的に、かつ高収率で α , α -トレハロースが生成することを知見した。

よって、本発明は、更にまた、上記したような本発明のアミラーゼとトランスフェラーゼとを組み合わせて用いることを特徴とする α , α -トレハロースの製造法を提供するものである。

また、本発明は新規アミラーゼ、およびその遺伝子の提供をその目的としている。

また、本発明は前記遺伝子を用いた組換え新規アミラーゼおよびその製造法の提供をその目的としている。

さらに本発明は、組換え新規アミラーゼを用いた α ， α -トレハロースの製造法の提供をその目的としている。

従って、本発明によるアミラーゼ遺伝子は、

(1) 糖鎖中の α -1, 4グルコシド結合をエンド型で加水分解する活性、

(2) 少なくとも還元末端から3つ以上の糖がグルコース単位で構成され、かつその結合が α -1, 4結合である3糖以上の糖を基質とし、還元末端側から加水分解して主に単糖および／または2糖を遊離する活性、および

(3) 少なくとも還元末端側の3糖がグルコース単位で構成され、該末端側の1つ目と2つ目のグルコース間の結合が α -1, α -1結合であり、かつ該末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の結合が α -1, 4結合である3糖以上の糖を基質とし、2つ目と3つ目のグルコース間の α -1, 4結合を加水分解し、 α ， α -トレハロースを遊離する主要な活性を有する新規アミラーゼをコードするDNA配列を含んでなるもの、である。

また、本発明による組換え新規アミラーゼは上記遺伝子の発現産物である。

更に本発明による α ， α -トレハロースの製造法は、上記組換え新規アミラーゼ、および

少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が α -1, 4結合である三糖以上の糖を基質とし、その還

元末端の α - 1, 4 結合を α - 1, α - 1 結合に転移させる作用を有する新規トランスフェラーゼとを、

少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が α - 1, 4 結合である3糖以上の糖と接触させる工程を含んでなるもの、である。

図面の簡単な説明

図1は、実施例I-1で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1株由来の菌体抽出液による生成物の TSK-gel Amide-80 HPLC による分析結果を示すグラフである。

図2は、実施例I-2で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1株由来の本酵素トランスフェラーゼの温度安定性を示すグラフである。

図3は、実施例I-2で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1株由来の本酵素トランスフェラーゼの pH 安定性を示すグラフである。

図4は、実施例I-2で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1株由来の本酵素トランスフェラーゼの各温度における反応性を示すグラフである。

図5は、実施例I-2で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1株由来の本酵素トランスフェラーゼの反応至適 pH を示すグラフである。

図6は、実施例I-2で得た *Sulfolobus*

solfataricus KM1 株由来の本酵素トランスフェラーゼによる、マルトトリオースからの反応生成物のパターンを示すグラフである。

図 7 は、実施例 I - 2 で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の本酵素トランスフェラーゼによる、マルトテトラオースからの反応生成物のパターンを示すグラフである。

図 8 は、実施例 I - 2 で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の本酵素トランスフェラーゼによる、マルトペンタオースからの反応生成物のパターンを示すグラフである。

図 9 は、実施例 I - 2 で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の本酵素トランスフェラーゼによる、マルトオリゴ糖混合物からの反応生成物の AMINEX HPX-42A HPLC による分析結果を示すグラフである。

図 10 は、実施例 II - 1 で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1 株の粗酵素液を作用させたマルトトリオシルトレハロースからの反応生成物の TSK-gel Amide-80 HPLC による分析結果を示すグラフである。

図 11 は、実施例 II - 1 で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1 株の粗酵素液を作用させた可溶性デンプンからの反応生成物の AMINEX HPX-42A HPLC による分析結果を示すグラフである。

図 1 2 は、実施例 11-2 で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の本酵素アミラーゼの温度安定性を示すグラフである。

図 1 3 は、実施例 11-2 で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の本酵素アミラーゼの pH 安定性を示すグラフである。

図 1 4 は、実施例 11-2 で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の本酵素アミラーゼの各反応温度における反応性を示すグラフである。

図 1 5 は、実施例 11-2 で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の本酵素アミラーゼの反応至適 pH を示すグラフである。

図 1 6 は、実施例 11-2 で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の本酵素アミラーゼの各種基質に対する反応性を示すグラフである。

図 1 7 は、実施例 11-2 で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の本酵素アミラーゼを作用させたマルトペンタオース、アミロース DP-17、可溶性デンプンからの反応生成物の AMINEX HPX-42A HPLC による分析結果を示すグラフである。

図 1 8 は、実施例 11-2 で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の本酵素アミラーゼを作用させたマルトトリオシルトレハロースからの反応生成物の TSK-gel Amide-80 HPLC による分析結果を示すグラフで

ある。

図 19 は、実施例 11-2 で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の本酵素アミラーゼを作用させたマルトペンタオシルトレハロースからの反応生成物の TSK-gel Amide-80 HPLC による分析結果を示すグラフである。

図 20 は、実施例 11-2 で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の本酵素アミラーゼを可溶性デンプンに作用させたときのヨウ素発色の消失及びデンプン加水分解率の経時変化を示すグラフである。

図 21 は、実施例 11-2 で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の本酵素アミラーゼを作用させた放射活性ラベル化したマルトペンタオースからの反応生成物の放射活性の経時変化を示すグラフである。

図 22 は、実施例 11-2 で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の本酵素アミラーゼを作用させた放射活性ラベル化したマルトトリオシルトレハロースからの反応生成物の放射活性の経時変化を示すグラフである。

図 23 は、ブタ膵臓由来の α -アミラーゼの各種基質に対する反応性を示すグラフである。

図 24 は、ブタ膵臓由来の α -アミラーゼを作用させたマルトペンタオシルトレハロースからの反応生成物の TSK-gel Amide-80 HPLC による分析結果を示すグラフで

ある。

図 2 5 は、実施例 11-2 で得た *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の本酵素アミラーゼ及びトランスフェラーゼを作用させた可溶性デンプンからの反応生成物の AMINEX HPX-42A HPLC による分析結果を示すグラフである。

図 2 6 は、実施例 I-12 で得られた *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の新規トランスフェラーゼ遺伝子を含む pKT1、pKT11 および pKT21 の挿入断片の制限酵素地図を示した図である。

図 2 7 は、pKT22 プラスミドの構築方法を示した図である。

図 2 8 は、マルトリオースに組換え新規トランスフェラーゼを作用させたときの生成物の TSK-gel Amide-80 HPLC による分析結果を示した図である。

図 2 9 は、実施例 I-16 で得られた *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 株由来の新規トランスフェラーゼ遺伝子を含む p09T1 の挿入断片の制限酵素地図を示した図である。

図 3 0 は、p09T1 プラスミドの構築方法を示した図である。

図 3 1 は、*Sulfolobus solfataricus* KM1 株と

S u l f o l o b u s a c i d o c a l d a r i u s
A T C C 3 3 9 0 9 株由来の新規トランスフェラーゼの
アミノ酸配列の相同性を示した図である。

図 3 2 は、S u l f o l o b u s
s o l f a t a r i c u s K M 1 株と
S u l f o l o b u s a c i d o c a l d a r i u s
A T C C 3 3 9 0 9 株由来の新規トランスフェラーゼ遺
伝子の塩基配列の相同性を示した図である。

図 3 3 は、マルトオリゴ糖混合物に組換え新規トラン
スフェラーゼを作用させたときの生成物の AMINEX HPX-
42A HPLC による分析結果を示した図である。

図 3 4 は、S u l f o l o b u s
s o l f a t a r i c u s K M 1 株由来の新規アミラ
ーゼ遺伝子を含む p K A 1 の挿入断片の制限酵素地図を
示した図である。

図 3 5 は、p K A 2 の制限酵素地図を示した図であ
る。

図 3 6 は、(A) は本発明による組換え新規アミラー
ゼをマルトトリオシルトレハロースに作用させたときの
生成物の分析結果を示した図であり、また (B) は本発
明による組換え新規アミラーゼを可溶性デンプンに作用
させたときの生成物の分析結果を示した図である。

図 3 7 は、本発明による組換え新規アミラーゼを可溶
性デンプンに作用させたときのヨウ素発色の消失と、デ

ンブン加水分解率の経時的変化を示すグラフである。

図 3 8 は、*S u l f o l o b u s*
a c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9 株
由来の新規アミラーゼ遺伝子を含む p 0 9 A 1 の挿入断
片の制限酵素地図である。

図 3 9 は、p 0 9 A 2 より p 0 9 A 1 の作成方法を示
した図である。

図 4 0 は、*S u l f o l o b u s a c i d o c a l d a r i u s* A T C C 3 3
9 0 9 株、*S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s* K M 1 株由来の新
規アミラーゼのアミノ酸配列について相同性を比較した
図である。

図 4 1 は、*S u l f o l o b u s a c i d o c a l d a r i u s* A T C C 3 3
9 0 9 株、*S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s* K M 1 株由来の新
規アミラーゼ遺伝子の塩基配列について相同性を比較し
た図である。

図 4 2 は、1 0 % 可溶性デンプンに実施例 11-19 の
組換え新規アミラーゼおよび実施例 I-20 の組換え新
規トランスフェラーゼを作用させたときの生成物の分析
結果を示した図である。

発明を実施するための最良な形態微生物の寄託

本発明者らにより自然界から実質的に純粋な形で分離した後述の新菌株 K M 1 株は、平成 6 年（1994）4 月 1 日に受託番号 F E R M B P - 4 6 2 6 の番号のもとに工業技術院生命工学技術研究所に寄託されている。

本発明による新規トランスフェラーゼ遺伝子を含むプラスミド p K T 2 2（後記する実施例 I - 1 4 参照）で形質転換された大腸菌株 E . c o l i J M 1 0 9 / p K T 2 2 は、平成 6 年（1994 年）10 月 21 日に受託番号 F E R M B P - 4 8 4 3 の番号のもとに、またプラスミド p 0 9 T 1（後記する実施例 I - 1 6 参照）で形質転換された大腸菌 E . c o l i J M 1 0 9 / p 0 9 T 1 は平成 7 年（1995 年）5 月 9 日に受託番号 F E R M B P - 5 0 9 3 の番号のもとに工業技術院生命工学技術研究所に寄託されている。

また、本発明による新規アミラーゼ遺伝子を含むプラスミド p K A 2（後記する実施例 II - 1 9 参照）で形質転換された大腸菌株 E . c o l i J M 1 0 9 / p K A 2 は、平成 6 年（1994 年）10 月 31 日に受託番号 F E R M B P - 4 8 5 7 の番号のもとに、またプラスミド p 0 9 A 1（後記する実施例 II - 2 2 参照）で形質転換された大腸菌 E . c o l i J M 1 0 9 / p 0 9 A 1 は平成 7 年（1995 年）5 月 9 日に受託番号 F E R

M B P - 5 0 9 2 の番号のもとに工業技術院生命工
技術研究所に寄託されている。

I. 新規トランスフェラーゼ

本発明の新規トランスフェラーゼを産生する微生物

本発明において利用されうる古細菌としては、
S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
A T C C 3 5 0 9 1 (D S M 1 6 1 6) 株、
S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
D S M 5 8 3 3 株、S u l f o l o b u s
s o l f a t a r i c u s K M 1 株（本発明者らによ
り自然界から実質的に純粋な形で分離した後述の新菌
株）、S u l f o l o b u s
a c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9
(D S M 6 3 9) 株、A c i d i a n u s
b r i e r l e y i D S M 1 6 5 1 株等を挙げるこ
とができる。

本発明の新規トランスフェラーゼを産生する微生物は、
このように、分類学上 S u l f o l o b u s 及び
A c i d i a n u s 属が属する
S u l f o l o b a l e s 目に属するかなり広い範囲の
古細菌に及ぶと考えられる。ここにおいて、
S u l f o l o b a l e s 目とは、分類学上、高度好酸
性好熱性、好気性、硫黄細菌（球菌）として定義される
古細菌である。A c i d i a n u s 属に属する上記の

Acidianus briereleyi DSM
1651株は以前は *Sulfolobus*
briereleyi DSM 1651株として分類さ
れていた菌であり、また、上記の *Sulfolobus*
solfataricus DSM 5833株は以前
は *Caldariella acidophila* と命
名されていた菌である。よって、このような事実から、
上記の古細菌に遺伝学的に或いは分類学的に近縁であり、
かつ同種の酵素を産生しうる菌はすべて本発明において
使用できることは言うまでもない。

Sulfolobus solfataricus

K M 1 株

上記において例示した微生物の中で、

Sulfolobus solfataricus

K-M-1株は本発明者らが群馬県の温泉から分離した菌株
であって、次の様な性質を示すものである。

(1) 形態的性質

菌の形、大きさ：球菌（不規則） 直径 0.6 ~ 2 μ m

(2) 生育最適条件

pH：3 ~ 5.5の範囲で生育し、最適生育pHは

3.5 ~ 4.5

温度：55℃ ~ 85℃の範囲で生育し、最適生育温度は

75℃ ~ 80℃

硫黄を代謝できる

(3) 好気性、嫌気性の区別：好気性

以上の性質から、B e r g e y ' s M a n u a l
o f S y s t e m a t i c
B a c t e r i o l o g y V o l u m e 3 (198
9) に従い菌株の同定を行った結果、本菌株は
S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s に属
する菌株であり、従って本菌株を S u l f o l o b u s
s o l f a t a r i c u s K M 1 株と命名した。

上記の菌株の培養にあたっては、培地は液体でも固体
でもよく、通常は液体培地を用いた振とう培養又は通気
攪拌培養が行なわれる。このように、培地は生育に適す
るものであれば特に限定されず、例えば、

A m e r i c a n T y p e C u l t u r e
C o l l e c t i o n (A T C C) 発行
C a t a l o g u e o f B a c t e r i a a n d
P h a g e s 18 版 (1992) 及び
D e u t s c h e S a m m l u n g v o n
M i k r o o r g a n i s m e n u n d
Z e l l k u l t u r e n G m b H (D S M) 発行
C a t a l o g u e o f S t r a i n s 5 版

(1993) に記載の S u l f o l o b u s
s o l f a t a r i c u s M e d i u m 等を好ましく
用いることができる。更に糖源としてデンプン、マルト
オリゴ糖等を加えてもよい。また、培養条件も上記の生

育可能な温度及びpHのもとであれば特に限定されない。
本発明の新規トランスフェラーゼを産生する微生物の培養

本発明の新規トランスフェラーゼ産生のための培養条件は、該トランスフェラーゼを産生しうる範囲内で適宜選択すればよい。液体振とう培養又は通気攪拌培養の場合は各微生物が生育するpH、培養温度で、2日～7日間の培養が適当である。培地としては、例えば、

American Type Culture
Collection (ATCC) 発行
Catalogue of Bacteria and
Phages 18版 (1992) 及び
Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH (DSM) 発行
Catalogue of Strains 5版
(1993) に記載の *Sulfolobus*
solfataricus Medium等を好ましく
用いることができる。更に糖源としてデンプン、マルト
オリゴ糖等を加えてもよい。

本発明の新規トランスフェラーゼの精製

上記微生物の産生する本発明の新規トランスフェラーゼの抽出は、まず上記のような培養方法により得られた培養物から公知の方法、例えば遠心分離により菌体を得

て、これを適切な緩衝液中に懸濁し、凍結融解、超音波処理、磨砕等により菌体を破碎し、遠心分離またはろ過により該トランスフェラーゼを含有する菌体抽出物を得る。

この菌体抽出物に存在する本発明の新規トランスフェラーゼの精製には、公知の分離、精製法を適当に組み合わせで行うことができる。例えば、塩沈澱及び溶媒沈澱のような溶解性を利用する方法、透析、限外ろ過、ゲルろ過及びSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーのような電荷の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーのような特異的親和性を利用する方法、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーのような疎水性の差を利用する方法、更に等電点電気泳動のような等電点の差を利用する方法等が挙げられる。これらの具体的な例は、後述の実施例I-2～I-5に示すとおりである。最終的にネイティブポリアクリルアミドゲル、SDSポリアクリルアミドゲル或いは等電点電気泳動にて単一バンドを示す酵素を精製酵素として得る。

上記したような各種の精製過程において分離された酵素或いは酵素含有物の活性測定に関しては、L a m a らの方法における活性測定法ではデンプンを基質として行っており、それによれば、トレハロースとグルコースの

生成は確認できるものの、トレハロースオリゴ糖の生成は全く検出できず、また、この方法では精製途中においてトレハロース生成活性さえも消失して確認できなくなるといふ大きな問題があり、酵素活性本体の精製、特定化は実質上不可能であった。ところが、本発明者らにより、マルトオリゴ糖（例えばマルトトリオース）を基質とし、トレハロースオリゴ糖（例えばグルコシルトレハロース）を生成する活性を指標とする新しい活性測定法を採用したところ、初めて目的とする酵素の単離精製が可能となり、ようやくにして、本発明の新規トランスフェラーゼ活性本体の精製及び特定化を実現し得たのである。

本発明の新規トランスフェラーゼの諸性質

本発明の酵素例として、*S u l f o l o b u s*
s o l f a t a r i c u s K M 1 株、
S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
D S M 5 8 3 3 株、*S u l f o l o b u s*
a c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9
株、*A c i d i a n u s b r i e r l e y i* D S M
1 6 5 1 株の微生物がそれぞれ産生したトランスフェラーゼについてそれらの酵素学的な諸性質を下記の第1表にまとめて示す。なお、表中のデータは、実施例 I - 6 及び 7 に示した具体例に基づくものである。

第 1 表

	Sulfolobus solfataricus	Sulfolobus solfataricus	Sulfolobus acidocaldarius	Acidianus brierleyi
酵素特性	KM1	DSM5833	ATCC33909	DSM1651
(1) 酵素作用 および 基質特異性	グルコースが α -1, 4で結合したマルトトリオース以上の グルコースポリマーの還元末端側の2糖を、転移により α -1, α -1で結合する。マルトース、グルコースには作用 しない。			
(2) 至適pH	5.0 ~ 6.0	4.5 ~ 5.5	4.5 ~ 5.5	4.5 ~ 5.5
(3) 安定pH	4.0 ~ 10.0	4.5 ~ 12.0	4.0 ~ 10.0	4.0 ~ 12.0
(4) 至適温度	60~80°C	70~80°C	70~80°C	70~80°C
(5) 温度安定性	85°C、6 hr 91% 残存	80°C、6 hr 90% 残存	80°C、6 hr 90% 残存	85°C、6 hr 98% 残存
(6) 分子量				
SDS-PAGE	76000	75000	74000	74000
ゲル濾過	54000	56000	56000	135000
(7) 等電点	6.1	5.3	5.6	6.3
(8) 阻害剤	5mM CuSO ₄ 100%阻害	5mM CuSO ₄ 100%阻害	5mM CuSO ₄ 100%阻害	5mM CuSO ₄ 100%阻害

註 1 : 経時変化

マルトトリオースを基質として用いた場合、主反応であるグルコシルトレハロースの生成とともに、副反応と

してマルトース及びグルコースが等モル生成された。

マルトテトラオース以上の重合度 n を持つ糖では、主反応として、還元末端のグルコース単位が $\alpha - 1$ 、 $\alpha - 1$ 結合した糖が生成され、同様に副反応として等モルずつの重合度 ($n - 1$) 糖及びグルコースが生成された。

註 2 : 酵素作用 / 酵素反応様式

還元末端が $\alpha - 1$ ，4 結合でグルコースが 3 つ結合したマルトトリオース以上の糖の還元末端の糖を、転移により $\alpha - 1$ ， $\alpha - 1$ で結合させる活性を有する酵素と考えられる。また基質濃度が低い場合、及び長時間反応させた場合等においては、副反応、即ち、グルコースポリマーからグルコースを遊離する活性も有する。この詳細は、実施例 I - 7 の具体例において示す通りである。

以上、本酵素の諸性質を述べたが、酵素作用 / 酵素反応様式のところで述べたように、本酵素の活性は、還元末端が $\alpha - 1$ ，4 結合でグルコースが 3 つ結合したマルトトリオース以上の糖の還元末端の糖を、転移により $\alpha - 1$ ， $\alpha - 1$ で結合させるという活性であり、これは全く新規な酵素活性である。但し、以下の実施例において明らかなように、このような酵素活性以外の本酵素の諸性質に関しては、菌株の属或いは種の違いにより若干の差違がある。

グルコシルトレハロース及びマルトオリゴシルトレハロース等のトレハロースオリゴ糖の製造

本発明は、本酵素を用い、少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が $\alpha-1, 4$ 結合である3糖以上の糖を基質として作用させ、少なくとも還元末端側の3糖がグルコース単位で構成され、該末端側の1つ目と2つ目のグルコース間の結合が $\alpha-1, \alpha-1$ 結合で、該末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の結合が $\alpha-1, 4$ 結合である糖を製造することを特徴とする末端の2糖が $\alpha-1, \alpha-1$ 結合である糖の製造法を提供するものであるが、該本発明の製造法を、最も典型的な具体例、即ち、グルコシルトレハロース及びマルトオリゴシルトレハロース等のトレハロースオリゴ糖の製造法でもって以下説明する。

本発明におけるグルコシルトレハロース及びマルトオリゴシルトレハロース等のトレハロースオリゴ糖の製造法は、古細菌が産生する本酵素によって、マルトオリゴ糖等の糖から、典型的には、マルトオリゴ糖各単独又はそれらの混合物から、グルコシルトレハロース及びマルトオリゴシルトレハロース等のトレハロースオリゴ糖を製造するものである。従って、古細菌が産生する本酵素がマルトオリゴ糖等の糖に作用可能な様態である限り、本酵素トランスフェラーゼとマルトオリゴ糖等の糖との接触の様態は特に限定されない。具体的には、一般的に、

古細菌の菌体或いは菌体破砕物から粗酵素を得、次いで各種精製工程で得られた精製酵素、或いは各種精製手段を経て単離精製された酵素を直接マルトオリゴ糖等の糖に作用させればよい。或いは、上記酵素を常法に準じて担体に固定化し、固定化した酵素としてマルトオリゴ糖等の糖に接触させてもよい。なお、古細菌の複数種から得た二つ以上の本酵素を共存させて、マルトオリゴ糖等の糖と接触させてもよい。

上記の本発明の製造法において代表的な基質原料であるマルトオリゴ糖の混合物は、例えばデンプンをエンド型アミラーゼ、枝切り酵素などによる分解或いは酸分解に処し、少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が $\alpha-1, 4$ 結合であるように適宜分解することにより製造し得る。その際エンド型アミラーゼとしては、

例えば、*Bacillus* 属等のバクテリア、

Aspergillus 属等のかび、麦芽等の植物由来の酵素等が利用できる。また枝切り酵素については、例えば、*Bacillus* 属、*Klebsiella* 属等バクテリア由来のプルナーゼ、*Pseudomonas* 属由来のイソアミラーゼ等が利用できる。更にこれらの酵素を組み合わせても利用できる。

マルトオリゴ糖等の糖の使用濃度は、用いる糖が溶解されうる範囲であれば、本酵素の比活性、反応温度等を考慮して適宜選択すればよい。0.5～70%の範囲と

するのが一般的であり、好ましくは 5 ~ 40 % の範囲である。糖と酵素との反応における反応温度及び pH 条件は、本酵素トランスフェラーゼの最適条件下で行うことが好ましい。よって、50 ~ 85 °C 程度、pH 3.5 ~ 6.5 程度の条件下で行うのが一般的であり、好ましくは 60 ~ 80 °C、pH 4.5 ~ 6.0 の範囲である。

生成されたグルコシルトレハロース或いはマルトオリゴシルトレハロース等のトレハロースオリゴ糖を含む反応液は、公知の方法に従い精製することができる。例えば、得られた反応液をイオン交換樹脂により脱塩し、活性炭、イオン交換樹脂 (HSO₃型) 又は陽イオン交換樹脂 (Ca型) 等を分離剤とするクロマトグラフィーによって目的の糖画分を分離し、又は更に続いて濃縮し、結晶化することにより、高純度のトレハロースオリゴ糖を得ることができる。

新規トランスフェラーゼをコードする遺伝子

本発明によれば、更に上記の新規トランスフェラーゼをコードする遺伝子が提供される。

本発明による新規トランスフェラーゼをコードしている遺伝子を含んでなる DNA 断片としては、例えば図 26 または図 29 に示される制限酵素地図で表される DNA 断片が挙げられる。

この DNA 断片は、*Sulfolobales* 目に属する古細菌から得ることが出来、好ましくは

S u l f o l o b u s 属に属する古細菌、より好ましくは後記する S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s K M 1 株、または S u l f o l o b u s a c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9 株から単離することが出来る。 S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s K M 1 株、および S u l f o l o b u s a c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9 株からのその好ましい単離法については、後記する実施例において詳細に説明されている。

この D N A 断片を取得可能と思われる起源の具体例としては、さらに S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s D S M 5 3 5 4 株、 D S M 5 8 3 3 株、 A T C C 3 5 0 9 1 株、 A T C C 3 5 0 9 2 株、 S u l f o l o b u s a c i d o c a l d a r i u s A T C C 4 9 4 2 6 株、 S u l f o l o b u s s h i b a t a e D S M 5 3 8 9、 A c i d i a n u s b r i e r l e y i D S M 1 6 5 1 株等を挙げることができる。これらの古細菌が、本発明による D N A 断片の起源となりうることは、後記する実施例 I - 1 7 のハイブリダイゼーション試験において、 S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s K M 1 株由来の新規トランスフェラーゼ遺伝子が、これら古細菌の染色体 D N A と

ハイブリッドを形成すること、さらには、上記したように酵素自体の性質も酷似していることを示していることから明らかである。更にこの実施例の結果は、本発明による新規トランスフェラーゼ遺伝子が、*Sulfolobales* 目に属する古細菌に特異的に高度に保存されていることを示しているといえる。

本発明の好ましい態様によれば、本発明による新規トランスフェラーゼをコードしている遺伝子の好ましい具体例として、配列番号 2 または 4 に示されるアミノ酸配列をコードする DNA 配列を含んでなる DNA 断片が提供される。さらに、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列をコードする DNA 配列の好ましい具体例としては、配列番号 1 に示される塩基配列の 335 番から 2518 番までの塩基配列が挙げられる。配列番号 4 に示されるアミノ酸配列をコードする DNA 配列の好ましい具体例としては、配列番号 3 に示される塩基配列の 816 番から 2855 番までの塩基配列が挙げられる。

一般に、タンパク質のアミノ酸配列が与えられれば、それをコードする塩基配列は、いわゆるコドン表を参照して容易に定まる。よって配列番号 2 または 4 に示されるアミノ酸配列をコードする種々の塩基配列を適宜選択することが可能である。従って、本発明において「配列番号 2 に示されるアミノ酸をコードする DNA 配列」とは、配列番号 1 に示される塩基配列の 335 番から 25

18番の配列を有するもの、およびその縮重関係にあるコドンが使用されている以外は同一の塩基配列を有しかつ配列番号2に示されるアミノ酸をコードする塩基配列をも意味するものとする。また「配列番号4に示されるアミノ酸をコードするDNA配列」とは、配列番号3に示される塩基配列の816番から2855番の配列を有するもの、およびその縮重関係にあるコドンが使用されている以外は同一の塩基配列を有しかつ配列番号4に示されるアミノ酸をコードする塩基配列をも意味するものとする。

さらに、後記するように本発明による新規トランスフェラーゼには、配列番号2または4に示されるアミノ酸配列の等価配列をも包含するものである。従って、本発明によるDNA断片には、さらにこの等価配列をコードする塩基配列も包含される。

なお、配列番号1または3に示される塩基配列と同一性を有する配列の存在について、塩基配列データベース(EMBL)を通じて、配列解析ソフトジェネティックス(ソフトウェア開発)を用いて調べた結果、そのような配列は存在しないことを本発明者らは確認している。

本発明による配列番号1に示される塩基配列の335番から2518番の配列を有するDNA断片、および配列番号3に示される塩基配列の816番から2518番の配列を有するDNA断片は塩基配列が定まっているこ

とから、そのDNA断片を取得する一つの手段は核酸合成の手法に従って製造することである。

またこの配列は、前記した *Sulfolobales* 目に属する古細菌、好ましくは *Sulfolobus solfataricus* KM1株、または *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909株から遺伝子工学的な手法を用いて得ることが出来る。例えば、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook, Maniatisら、Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989))などに記載の手法で好ましく行うことができる。具体的な方法は、後記する実施例に詳細に説明されている。

組換え新規トランスフェラーゼ

上記の通り、新規トランスフェラーゼの遺伝子が提供されたことから、本発明によれば、この遺伝子の発現産物である組換え新規トランスフェラーゼが提供される。

本発明による組換え新規トランスフェラーゼの好ましい具体例としては、図26または図29に示される制限酵素地図で表されるDNA断片の発現産物が挙げられる。

更に、好ましい具体例としては、配列表の配列番号2または4に示されるアミノ酸配列またはその等価配列を含んでなるポリペプチドが挙げられる。ここで、「その

等価配列」とは、配列番号 2 または 4 に示されるアミノ酸配列において、いくつかのアミノ酸の挿入、置換または欠失、若しくは両末端への付加がなされたものであって、かつその新規トランスフェラーゼ作用を依然として保持するものをいうものとする。その等価配列における新規トランスフェラーゼ作用の保持とは、その作用を利用した実際の使用態様において、配列番号 2 または 4 に示される配列を全て有するポリペプチドと、同一の条件でほぼ同様の利用が可能な程度の活性が維持されていることをいうものとする。このような「等価配列」は具体的に実施例 I - 18 において *Sulfolobus solfataricus* KM1 株、および *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 株の 2 株の間で新規トランスフェラーゼのアミノ酸配列の相同性がギャップを考慮して計算した場合 49% であっても同一の活性が保持されていることから、配列番号 2 および 4 に示される配列を参照すれば、当業者であれば格別の困難性なしに選択し、製造可能であることは明らかである。

後記する実施例 I - 17 において明らかにされているように、配列番号 1 および 3 に示される配列を有する DNA 断片が、この DNA 断片の起源である *Sulfolobus solfataricus* KM1 株、および *Sulfolobus*

a c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9 株
以外の他の菌株由来のDNA断片とハイブリッドを形成
している。一方、上記したように、これらの菌株から性
質の酷似した新規トランスフェラーゼの存在を今般確認
した。また後記する実施例 I - 1 8 において明かにされ
るように、S u l f o l o b u s
s o l f a t a r i c u s K M 1 株 と
S u l f o l o b u s a c i d o c a l d a r i u s
A T C C 3 3 9 0 9 株の2株の間で、新規トランスフェ
ラーゼのアミノ酸配列の相同性はギャップを考慮して計
算した場合49%である。従って、配列番号2または4
に示されるアミノ酸配列とある程度の相同性ある配列に
おいて、新規トランスフェラーゼ活性が保持されうるこ
とは当業者に明らかであるといえる。

なお、配列番号2および4に示されるアミノ酸配列と
相同性を有する配列の存在について、アミノ酸配列デー
タバンク (S w i s s p r o t、および N B R F -
P F B) を通じて、配列解析ソフトジェネティックス
(ソフトウェア開発) を用いて調べた結果、そのような
配列は存在しないことを本発明者らは確認している。

新規トランスフェラーゼをコードする遺伝子の発現

本発明による新規トランスフェラーゼをコードする
DNA断片を、宿主細胞内で複製可能でかつ同遺伝子が
発現可能な状態で含むDNA分子、特に発現ベクター、

の形態として宿主細胞の形質転換を行えば、宿主細胞において本発明による組換え新規トランスフェラーゼを産生させることができる。

従って、本発明によれば、さらに本発明による新規トランスフェラーゼをコードする遺伝子を含んだDNA分子、特に発現ベクター、が提供される。このDNA分子は、ベクター分子に本発明による新規トランスフェラーゼをコードするDNA断片を組み込むことによって得ることが出来る。本発明の好ましい態様によれば、このベクターはプラスミドである。

この本発明によるDNA分子の作成は前掲の
M o l e c u l a r C l o i n g : A
L a b o r a t o r y M a n u a l に記載の方法に準じて行うことができる。

本発明において利用されるベクターは、使用する宿主細胞の種類を勘案しながら、ウイルス、プラスミド、コスミドベクターなどから適宜選択することができる。例えば、宿主細胞が大腸菌の場合はλファージ系のバクテリオファージ、pBR, pUC系のプラスミド、枯草菌の場合はpUB系のプラスミド、酵母の場合はYEp、YCp系のベクターが挙げられる。

このプラスミドは形質転換体の選択マーカを含むのが好ましく、選択マーカとしては薬剤耐性マーカ、栄養要求マーカ遺伝子を使用することができる。

さらに、本発明による発現ベクターとしてのDNA分子は、新規トランスフェラーゼ遺伝子の発現に必要なDNA配列、例えばプロモーター、転写開始信号、リボゾーム結合部位、翻訳停止シグナル、転写終結信号などの転写調節信号、翻訳調節信号などを有しているのが好ましい。

プロモーターとしては、挿入断片に含まれる宿主中でも機能することができるプロモーターはもちろんのこと、大腸菌においてはラクトースオペロン (lac)、トリプトファンオペロン (trp) 等のプロモーター、酵母ではアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 (ADH)、酸性フォスファターゼ遺伝子 (PHO)、ガラクトース遺伝子 (GAL)、グリセロールアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (GPD) 等のプロモーターが好ましく用いることができるものとして挙げられる。

ここで、配列番号1に示される塩基配列の1番から2578番までの塩基配列および配列番号3に示される塩基配列の1番から3467番までの塩基配列は、上記の発現に必要な配列を含んでいると思われることから、この配列をそのまま利用するのも好ましい。

また、宿主細胞が枯草菌、酵母の場合には、分泌型ベクターを使用して、菌体外に組換え新規トランスフェラーゼ酵素を分泌することも有利である。

宿主細胞としては、大腸菌の他に、枯草菌、酵母、高

等真核生物を用いることができる。枯草菌としては例えば *Bacillus* 属に属する微生物を用いることが好ましい。該属には、タンパク質を多く菌体外へ分泌する株が存在することが知られている。従って、分泌型ベクターを用いることにより、培養液中に多量の組換え新規アミラーゼを分泌させることが出来る。さらに培養上清からの精製も容易となるので好ましい。また、該属には菌体外にプロテアーゼをほとんど分泌しない株も知られており、このような株を用いることにより、本発明による組換え新規アミラーゼを効率よく生産することが出来るので好ましい。また、宿主細胞としてグルコアミラーゼを産生しない生物を選択すると、菌体抽出液、または簡単な精製を行った粗酵素の状態でも本発明による組換え新規トランスフェラーゼを得て、それをそのまま後記するトレハロースオリゴ糖の製造に用いることができるので、極めて有利である。

前記した形質転換体の産生する組換え新規トランスフェラーゼは、次のようにして得ることが出来る。まず上記の宿主細胞を適切な条件下で培養し、得られた培養物から公知の方法、例えば遠心分離により菌体を得て、これを適切な緩衝液中に懸濁し、凍結融解、超音波処理、磨砕等により菌体を破碎し、遠心分離またはろ過により組換え新規トランスフェラーゼを含有する菌体抽出物を得る。

この菌体抽出物に存在する組換え新規トランスフェラーゼの精製には、公知の分離、精製法を適当に組み合わせて行うことができる。例えば、熱処理のような耐熱性の差を利用する方法、塩沈澱および溶媒沈澱のような溶解性の差を利用する方法、透析、限外ろ過、ゲルろ過およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーのような電荷の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーのような特異的親和性を利用する方法、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーのような疎水性の差を利用する方法、更に等電点電気泳動のような等電点の差を利用する方法等が挙げられる。この組換え新規トランスフェラーゼは耐熱性を有するため、熱処理により宿主のタンパク質を変性させることにより、これを沈澱として除去できるため、精製を非常に簡単に行うことができる。

組換え新規トランスフェラーゼを用いたトレハロースオリゴ糖の製造

更に本発明によれば、上記の組換え新規トランスフェラーゼを用いた、グルコシルトレハロースおよびマルトオリゴシルトレハロース等のいわゆるトレハロースオリゴ糖の製造法が提供される。

すなわち、本発明による方法は、少なくとも還元末端側の三糖がグルコース単位で構成され、該末端側の1つ

目と2つ目のグルコース間の結合が α -1, α -1結合で、該末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の結合が α -1, 4結合であるトレハロースオリゴ糖の製造法であって、上記組換え新規トランスフェラーゼを、少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が α -1, 4結合である三糖以上の糖と接触させることを含んでなる。

少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が α -1, 4結合である三糖以上の糖は特に限定されないが、デンプン、デンプン分解物、マルトオリゴ糖等が挙げられる。ここでデンプン分解物としては、デンプンをエンド型アミラーゼ、枝切り酵素などによる分解または酸分解に付し、少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が α -1, 4結合であるように適宜分解することにより製造されたものが挙げられる。ここで用いられるエンド型アミラーゼとしては、例えば、

Bacillus 属等のバクテリア、

Aspergillus 属等のかび、麦芽等の植物由来の酵素等が利用できる。また枝切り酵素としては、例えば *Bacillus* 属、*Klebsiella* 属等バクテリア由来のプルラーゼ、*Pseudomonas* 属由来のイソアミラーゼ等が利用できる。更にこれらの酵素を組み合わせ利用することも可能である。

本発明による組換え新規トランスフェラーゼと、少な

くとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が α -1, 4結合である三糖以上の糖との接触態様およびその条件は、組換え新規トランスフェラーゼが該糖に作用可能な態様である限り特に限定されない。溶液中で接触させる場合の好ましい態様を示せば次の通りである。すなわち、マルトオリゴ糖等の糖の使用濃度は、用いる糖が溶解される範囲であれば、本酵素の比活性、反応温度等を考慮して適宜選択してよいが、0.5～70%の範囲とするのが一般的であり、好ましくは5～40%の範囲である。糖と酵素との反応における反応温度およびpH条件は、組換え新規トランスフェラーゼの最適条件下で行うことが好ましい。よって、50～85℃程度、pH 3.5～6.5程度の条件下で行うのが一般的であり、好ましくは60～80℃、pH 4.5～6.0の範囲である。

また、組換え新規トランスフェラーゼの精製の程度も適宜選択することができ、形質転換体の菌体破砕物から粗酵素のまま用いることもでき、また、各種精製工程で得られた精製酵素として利用してもよい。さらには各種精製手段を経て単離精製された酵素として用いてもよい。

さらに酵素は、常法に準じて担体に固定化し、固定化した状態で、糖と接触させてもよい。

生成したグルコシルトレハロース、マルトオリゴシルトレハロース等のトレハロースオリゴ糖は、反応液を公

知の方法に従い精製することにより得ることが出来る。
例えば、得られた反応液をイオン交換樹脂により脱塩し、活性炭、イオン交換樹脂（H S O 3 型）又は陽イオン交換樹脂（C a 型）等を分離剤とするクロマトグラフィーによって目的の糖画分を分離し、又は更に続いて濃縮し、結晶化することにより、高純度のトレハロースオリゴ糖を得ることができる。

11. 新規アミラーゼ

本発明の新規アミラーゼを産生する微生物

本発明において利用されうる古細菌としては、
S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
K M 1 株（本発明者らにより自然界から実質的に純粋な形で分離した前述の新菌株）、S u l f o l o b u s
s o l f a t a r i c u s D S M 5 8 3 3 株、
S u l f o l o b u s a c i d o c a l d a r i u s
A T C C 3 3 9 0 9 （D S M 6 3 9 ）株等を挙げる
ことができる。

本発明の新規アミラーゼを産生する微生物は、このように、分類学上 S u l f o l o b a l e s 目に属するかなり広い範囲の古細菌に及ぶと考えられる。ここにおいて、S u l f o l o b a l e s 目とは、分類学上、高度好熱性（温度：55℃～88℃の範囲で生育）、好酸性（p H：1～6の範囲で生育）、好気性、硫黄細菌（球菌（不規則）：直径0.6～2μm）として定義される

古細菌である。上記の *Sulfolobus solfataricus* DSM 5833 株は以前は *Caldariella acidophila* と命名されていた菌である。よって、このような事実から、上記の古細菌に遺伝学的に或いは分類学的に近縁であり、かつ同種の酵素を産生しうる菌、及び該菌の菌株を各種変異剤によって処理して得られる変異株はすべて本発明において使用できることは言うまでもない。

上記において例示した微生物の中で、
Sulfolobus solfataricus KM1 株は本発明者らが群馬県の温泉から分離した菌株であって、その性質、培養法並びに寄託に関しては、前述において詳しく説明したとおりのものである。

本発明の新規アミラーゼを産生する微生物の培養

本発明の新規アミラーゼ産生のための培養条件は、該アミラーゼを産生しうる範囲内で適宜選択すればよい。液体振とう培養又は通気攪拌培養の場合は各微生物が生育する pH、培養温度で、2日～7日間の培養が適当である。培地としては、例えば、*American Type Culture Collection (ATCC) 発行 Catalogue of Bacteria and Phages* 18版 (1992) 及び *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und*

Z e l l k u l t u r e n G m b H (D S M) 発行
C a t a l o g u e o f S t r a i n s 5 版
(1 9 9 3) に記載のものを好ましく用いることができる。更に糖源としてデンプン、マルトオリゴ糖等を加えてもよい。

本発明の新規アミラーゼの精製

上記微生物の産生する本発明の新規アミラーゼの抽出は、まず上記のような培養方法により得られた培養物から公知の方法、例えば、遠心分離により菌体を得て、これを適切な緩衝液中に懸濁し、凍結融解、超音波処理、磨砕等により菌体を破碎し、遠心分離又はろ過により該アミラーゼを含有する菌体抽出物を得る。

この菌体抽出物に存在する本発明の新規アミラーゼの精製には、公知の分離、精製法を適当に組み合わせて行うことができる。例えば、塩沈澱及び溶媒沈澱のような溶解性を利用する方法、透析、限外ろ過、ゲルろ過、及び S D S - ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーのような電荷の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーのような特異的親和性を利用する方法、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーのような疎水性の差を利用する方法、更に等電点電気泳動のような等電点の差を利用する方法等が挙げられる。これらの具体的な例は、後述の実施例 11-2 ~ 11-4 に示す

とおりである。最終的にネイティブポリアクリルアミドゲル、SDSポリアクリルアミドゲル或いは等電点電気泳動にて単一バンドを示す酵素を精製酵素として得る。

上記したような各種の精製過程において分離された酵素或いは酵素含有物の活性測定に関しては、L a m a らの方法における活性測定法ではデンプンを基質として行っており、それによれば、各種アミラーゼが複数存在している状態ではデンプンの分解が検出できるものの、それらのアミラーゼがそれぞれ分離された状態では検出感度、定量性が共に低く、また、この方法では精製途中においてデンプン分解活性はほとんど消失して確認できなくなるといふ大きな問題があり、酵素活性本体の精製、特定化は実質上不可能であった。ところが、本発明者らにより、トレハロースオリゴ糖（例えばマルトトリオシルトレハロース）を基質とし、 α 、 α -トレハロースとマルトオリゴ糖（例えばマルトトリオース）に分解する活性を指標とする新しい活性測定法を採用したところ、非常に特異性、検出感度、及び定量性が高く、初めて目的とする酵素の単離精製が可能となり、ようやくにして、本発明の新規アミラーゼ活性本体の精製及び特定化を実現し得たのである。

本発明の新規アミラーゼの諸性質

本発明の酵素例として、S u l f o l o b u s
s o l f a t a r i c u s K M 1 株、
S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
D S M 5 8 3 3 株、及び S u l f o l o b u s
a c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9
(D S M 6 3 9) 株の古細菌がそれぞれ産生した新規
アミラーゼについてそれらの酵素学的な諸性質を下記の
第2表にまとめて示す。なお、表中のデータは、実施例
11-5に示した具体例に基づくものである。

第 2 表

	Sulfolobus solfataricus	Sulfolobus solfataricus	Sulfolobus acidocaldarius
酵素特性	KM1	DSM5833	ATCC33909
(1) 酵素作用 及び 基質特異性	グルコースが $\alpha-1, 4$ で結合したマルトトリオース以上の のグルコースポリマーをエンド型で加水分解する。また還元 末端から主として単糖、2糖を生成する活性を有する。 特に還元末端側の結合が $\alpha-1, \alpha-1$ 結合であり、それ以 外が $\alpha-1, 4$ 結合であるトレハロースオリゴ糖から α, α -トレハロースを遊離する活性が高い。		
(2) 至適 pH	4.5 ~ 5.5	4.5 ~ 5.5	5.0 ~ 5.5
(3) 安定 pH	3.5 ~ 10.0	3.0 ~ 12.0	4.0 ~ 13.0
(4) 至適温度	70 ~ 85°C	70 ~ 85°C	60 ~ 80°C
(5) 温度安定性	85°C、6 hr 100% 残存	85°C、6 hr 100% 残存	80°C、6 hr 100% 残存
(6) 分子量			
SDS-PAGE	61,000	62,000	64,000
(7) 等電点	4.8	4.3	5.4
(8) 阻害剤	5mM CuSO ₄ 100%阻害	5mM CuSO ₄ 100%阻害	5mM CuSO ₄ 100%阻害

註 1 : 経時変化

可溶性デンプンを基質として用いた場合、反応初期に

ヨウ素デンプン反応が速やかに消失し、引き続き、マルトース、グルコースを主成分として若干量のマルトリオース、マルトテトラオースを生成するように分解した。

註 2 : 酵素作用 / 酵素反応様式

本酵素はデンプン、デンプン分解物、及びマルトオリゴ糖を基質とした場合、加水分解反応により主にグルコース、マルトースを生成し、少量のマルトリオース、マルトテトラオースを生成する。本活性の作用機作についてはこれらの基質に対してエンド型に作用するアミラーゼ活性と共にその還元末端側から主に単糖、2糖を生成する活性を有する。

特に、還元末端側の1つ目と2つ目のグルコース間の結合が $\alpha-1$, $\alpha-1$ 結合で、該末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の結合が $\alpha-1$, 4結合である3糖以上の糖(例えばトレハロースオリゴ糖)との反応性が高く、これを基質とした場合、還元末端側から2つ目と3つ目のグルコース間の $\alpha-1$, 4結合を加水分解して反応の初期に特異的に α , α -トレハロースを遊離する活性を有する。

よって、本酵素は新規なアミラーゼであると考えられる。この詳細は、実施例II-5の具体的な例において示す通りである。

以上、本酵素の諸性質を述べたが、第2表及び後述の実施例から明らかなように、酵素活性以外の本酵素の諸

性質に関しては、菌株の属或いは種の違いにより若干の差異があるのが認められる。

α , α -トレハロースの製造において用いられるトランスフェラーゼ

本発明の α , α -トレハロースの製造法において使用するトランスフェラーゼとしては、前述の I. 新規トランスフェラーゼの項において詳説した本発明のトランスフェラーゼを用いることができる。具体的には、例えば
S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
A T C C 3 5 0 9 1 (D S M 1 6 1 6) 株、
S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
D S M 5 8 3 3 株、S u l f o l o b u s
s o l f a t a r i c u s K M 1 株、
S u l f o l o b u s a c i d o c a l d a r i u s
A T C C 3 3 9 0 9 (D S M 6 3 9) 株、
A c i d i a n u s b r i e r l e y i D S M
1 6 5 1 株等が産生するトランスフェラーゼを挙げることができる。

上記トランスフェラーゼは、例えば、後述する実施例 I - 2 ~ I - 5 に示す方法に従って製造することができる。こうして得られたトランスフェラーゼは後述の実施例 I - 6 において示すような諸性質を有するものである。

α , α -トレハロースの製造

本発明は、本発明の新規アミラーゼとトランスフェラーゼとを用いて、 α , α -トレハロースを製造する方法を提供するものであるが、該本発明の製造法を、最も典型的な具体例、即ち、デンプン、デンプン分解物、及びマルトオリゴ糖等の糖原料から、 α , α -トレハロースを製造する方法でもって以下説明する。なお、デンプン等に上記の2つの酵素が作用する機構は、多分、以下の通りであると考えられる。すなわち、デンプン、デンプン分解物、或いはマルトオリゴ糖に本発明の新規アミラーゼがそのエンド型活性により、まず作用してこのものをアミロース又はマルトオリゴ糖に分解し、続いて、トランスフェラーゼの作用によって該アミロース又はマルトオリゴ糖の還元末端の $\alpha-1, 4$ 結合を $\alpha-1, \alpha-1$ 結合に転位させ、更に、再び新規アミラーゼが作用して α , α -トレハロースと、重合度を2つ減じたアミロース又はマルトオリゴ糖を生成し、こうして生じたアミロース又はマルトオリゴ糖に上記の反応が繰り返されて、延いては、高収率で α , α -トレハロースが生成されるようになるのではないかと考えられる。

このような作用機構は、還元末端側の1つ目と2つ目のグルコース間の結合が $\alpha-1, \alpha-1$ 結合で、該末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の結合が $\alpha-1, 4$ 結合である3糖以上の糖（例えばトレハロースオリゴ糖）

に対する反応性が、それぞれ対応するマルトオリゴ糖との反応性に比較して高く、上記の3糖以上の糖の還元末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の $\alpha-1, 4$ 結合を特異的に加水分解して α, α -トレハロースを遊離するという、本発明の新規アミラーゼの特異的な反応様式に起因するものと考えられる。

本発明者らの知る限りでは、従来知られているアミラーゼで、マルトオリゴ糖の還元末端が $\alpha-1, \alpha-1$ 結合となったマルトオリゴシルトレハロースを、その $\alpha-1, \alpha-1$ 結合のとなりの $\alpha-1, 4$ 結合の位置で特異的に加水分解し、収率よく α, α -トレハロースを遊離する活性を有するものはなく、従って α, α -トレハロースを高い収率で生成することはほとんど不可能であった。

本発明における α, α -トレハロースの製造法は、古細菌が産生する本発明のアミラーゼ（本酵素）がデンプン、デンプン分解物、及びマルトオリゴ糖等の糖に作用可能な様態である限り、該アミラーゼ、及びトランスフェラーゼとデンプン、デンプン分解物、及びマルトオリゴ糖等の糖との接触の様態は特に限定されない。具体的には、一般的に、古細菌の菌体或いは菌体破碎物から粗酵素を得、次いで各種精製工程で得られた精製酵素、或いは各種精製手段を経て単離精製された酵素を直接デンプン、デンプン分解物、或いはマルトオリゴ糖等の糖に

作用させればよい。或いは、そのようにして得た酵素を担体に固定化し、固定化された酵素としてデンプン、デンプン分解物、或いはマルトオリゴ糖等の糖に接触させてもよい。なお古細菌の複数種から得た二つ以上の本酵素を共存させて、デンプン、デンプン分解物、或いはマルトオリゴ糖等の糖と接触させてもよい。

本発明の α , α -トレハロースの製造法において、上記アミラーゼ、及びトランスフェラーゼの使用量については、いずれも最適範囲内で使用されるべきである。即ち、過剰のアミラーゼは、還元末端がトランスフェラーゼにより作用を受けていないデンプン、デンプン分解物、或いはマルトオリゴ糖に作用してグルコース、マルトースを生成するようになり、一方、過剰のトランスフェラーゼは、同酵素によって生成したマルトオリゴシルトレハロース等のトレハロースオリゴ糖を副反応により分解し、グルコースを生成するようになるからである。

具体的には、アミラーゼ及びトランスフェラーゼの基質に対する濃度は、それぞれ1.5 U/ml及び0.1 U/ml以上、好ましくはそれぞれ1.5 U/ml及び1.0 U/ml以上、更に好ましくはそれぞれ1.5 U/ml及び1.0 U/ml以上であり、また、アミラーゼ対トランスフェラーゼの濃度比は100～0.075、好ましくは40～3である。

デンプン、デンプン分解物、及びマルトオリゴ糖等の

糖の使用濃度は、用いる糖が溶解されうる範囲であれば、用いる酵素の比活性、反応温度等を考慮して適宜選択すればよい。0.5～70%の範囲とするのが一般的であり、好ましくは5～40%の範囲である。糖と酵素との反応における反応温度及びpH条件は、アミラーゼ、及びトランスフェラーゼの最適条件で行うことが好ましい。よって、50～85℃程度、pH3.5～8程度の条件下で行うのが一般的であり、好ましくは60～75℃、pH4.5～6.0の範囲である。

また、用いる糖原料が高重合度のデンプン、デンプン分解物等の場合は、補助的に他のエンド型液化アミラーゼを併用することにより、 α , α -トレハロースの生成を促進させることができる。更にプルラナーゼ、イソアミラーゼ等の枝切り酵素を用いることもできる。この場合のエンド型アミラーゼ、プルラナーゼ、イソアミラーゼ等については、古細菌が産生する酵素である必要はない。よって、特に限定されないが、例えば、

Bacillus 属等のバクテリア、

Aspergillus 属等のかび、麦芽等の植物由来のアミラーゼが利用できる。また枝切り酵素については、例えば *Bacillus* 属、*Klebsiella* 属等バクテリア由来のプルラナーゼ（耐熱性のプルラナーゼを含む）、*Pseudomonas* 属由来のイソアミラーゼ等が利用できる。更にこれらの酵素どうしを組み合

わせても利用できる。

ただし、過剰量のアミラーゼの添加はトランスフェラーゼによって利用されないグルコース、マルトースを生成する可能性がある。また、枝切り酵素においても同様に、過剰量の添加は1, 6結合の切断による基質の溶解度の低下を引き起こし、利用されない高粘度の不溶物質（アミロース）を生じるようになる。よって、用いるアミラーゼ及び枝切り酵素等の量は、過剰のグルコース、マルトース、或いは不溶性物質を生成させないように注意して調節する必要がある。例えば、枝切り酵素に関しては、その使用濃度は、本発明のアミラーゼの比活性、反応温度等を考慮し、かつ不溶性物質を生成させない範囲で適宜選択する必要がある。具体的には、40℃にて1hr処理する場合は、基質に対して0.01～100 U/mlの範囲とするのが一般的であり、好ましくは0.1～25 U/mlの範囲である。（枝切り酵素の活性の定義については実施例II-6, 13及び14参照。）枝切り酵素を用いる場合は、 α , α -トレハロースの生成反応の前に予め基質を枝切り酵素にて前処理する方法、又は α , α -トレハロースの生成反応に際していずれかの段階でアミラーゼ及びトランスフェラーゼと共存させて用いる方法などいずれであってもよい。なお、その際枝切り酵素はいずれかの段階で1回以上組み合わせて用いるのが好ましく、特に初期の段階で1回以上組み合わ

せて用いるのが好ましい。なお、耐熱性枝切り酵素を用いる場合は α , α -トレハロース生成反応に際していずれかの段階、或いは初期の段階において、1回添加するのみで同様の効果が得られる。

生成された α , α -トレハロースを含む反応液は、公知の方法に従い精製することができる。例えば、得られた反応液をイオン交換樹脂により脱塩し、活性炭、イオン交換樹脂(HSO₃型)、又は陽イオン交換樹脂(Ca型)等を分離剤とするクロマトグラフィーによって目的の糖画分を分離し、又は更に続いて濃縮し、結晶化することにより、高純度の α , α -トレハロースを得ることができる。

新規アミラーゼをコードする遺伝子

本発明によれば更に上記の新規アミラーゼをコードする遺伝子が提供される。

本発明による新規アミラーゼをコードしている遺伝子を含むDNA断片の具体例としては、図34または図38に示される制限酵素地図で表されるDNA断片が挙げられる。

このDNA断片は、Sulfolobales目に属する古細菌から得ることが出来、好ましくはSulfolobus属に属する古細菌、より好ましくは後記するSulfolobus solfataricus KM1株、または

Sulfolobus acidocaldarius

ATCC 33909 株から単離することが出来る。

Sulfolobus solfataricus

KM1 株、および *Sulfolobus*

acidocaldarius ATCC 33909 株

からのその好ましい単離法については、後記する実施例において詳細に説明されている。

この DNA 断片を取得可能と思われる起源の具体例としては、さらに *Sulfolobus*

solfataricus DSM 5354 株、

DSM 5833 株、ATCC 35091 株、ATCC 3

5092 株 *Sulfolobus*

acidocaldarius ATCC 49426 株

Sulfolobus shibatae DSM 5

389 株 *Acidilobus brierleyi*

DSM 1651 株等を挙げることができる。これらの古

細菌が、本発明による DNA 断片の起源となりうることは、後記する実施例 II-24 のハイブリダイゼーション

試験において、*Sulfolobus*

solfataricus KM1 株 および

Sulfolobus acidocaldarius

ATCC 33909 株由来の新規アミラーゼ遺伝子が、

これら古細菌の染色体 DNA とハイブリッドを形成する

こと、さらには、上記したように酵素自体の性質も酷似

していることを示していることから明らかである。更にこの実施例の結果は、本発明による新規アミラーゼ遺伝子が、S u l f o l o b a l e s 目に属する古細菌に特異的に高度に保存されていることを示しているといえる。

本発明の好ましい態様によれば、本発明による新規アミラーゼをコードしている遺伝子の好ましい具体例として、配列番号6または8に示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列を含んでなるDNA断片が提供される。さらに、配列番号6に示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列の好ましい具体例としては、配列番号5に示される塩基配列の642番から2315番までの塩基配列が、また配列番号8のアミノ酸配列をコードするDNA断片の好ましい具体例として配列番号7に示される塩基配列の1176番から2843番が挙げられる。

一般に、タンパク質のアミノ酸配列が与えられれば、それをコードする塩基配列は、いわゆるコドン表を参照して容易に定まる。よって配列番号6または8に示されるアミノ酸配列をコードする種々の塩基配列を適宜選択することが可能である。従って、本発明において「配列番号6に示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列」とは、配列番号5に示される塩基配列の642番から2315番の配列を有するもの、およびその縮重関係

にあるコドンが使用されている以外は同一の塩基配列を有しかつ配列番号 6 に示されるアミノ酸をコードする塩基配列をも意味するものとする。また「配列番号 8 に示されるアミノ酸配列をコードする D N A 配列」とは、配列番号 7 に示される塩基配列の 1 1 7 6 番から 2 8 4 3 番の配列を有するもの、およびその縮重関係にあるコドンが使用されている以外は同一の塩基配列を有しかつ配列番号 8 に示されるアミノ酸をコードする塩基配列をも意味するものとする。

さらに、後記するように本発明による新規アミラーゼには、配列番号 6 または 8 に示されるアミノ酸配列の等価配列をも包含するものである。従って、本発明による D N A 断片には、さらにこの等価配列をコードする塩基配列も包含される。

そしてさらに、本発明による新規アミラーゼには、配列番号 6 に示されるアミノ酸配列の N 末端に更に M e t が付加した配列が包含される。よって、本発明による新規アミラーゼを含む D N A 断片には、配列番号 5 に示される塩基配列の 6 3 9 番から 2 3 1 5 番の配列を有するものが包含される。

なお、配列番号 5 および 7 に示される塩基配列と相同性を有する配列の存在について、塩基配列データバンク (E M B L) を通じて、配列解析ソフトジェネティックス (ソフトウェア開発) を用いて調べた結果、そのよ

うな配列は存在しないことを本発明者らは確認している。

本発明による配列番号5に示される塩基配列の639番または642番から2315番の配列を有するDNA断片、または配列番号7に示される塩基配列の1176番から2843番の配列を有するDNA断片は塩基配列が定まっていることから、そのDNA断片を取得する一つの手段は核酸合成の手法に従って製造することである。

またこの配列は、前記した

Sulfolobales目に属する古細菌、好ましくはSulfolobus solfataricus KM1株、またはSulfolobus acidocaldarius ATCC 33909株から遺伝子工学的な手法を用いて得ることが出来る。例えば、Molecular Cloning :

A Laboratory Manual

(Sambrook, Maniatisら、Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989))などに記載の手法で好ましく行うことができる。具体的な方法は、後記する実施例に詳細に説明されている。

組換え新規アミラーゼ

上記の通り、新規アミラーゼの遺伝子が提供されたことから、本発明によれば、この遺伝子の発現産物である組換え新規アミラーゼが提供される。

本発明による組換え新規アミラーゼの好ましい具体例としては、図34または図38に示される制限酵素地図で表されるDNA断片の発現産物が挙げられる。

更に、好ましい具体例としては、配列表の配列番号 6 または 8 に示されるアミノ酸配列またはその等価配列を含んでなるポリペプチドが挙げられる。ここで、「その等価配列」とは、配列番号 6 または 8 に示されるアミノ酸配列において、いくつかのアミノ酸の挿入、置換、または欠失、若しくは両末端への付加がなされたものであって、かつその上記した新規アミラーゼ活性を依然として保持するものをいうものとする。その等価配列における新規アミラーゼ活性の保持とは、その活性を利用した実際の使用態様において、配列番号 6 または 8 に示される配列を全て有するポリペプチドと、同一の条件でほぼ同様の利用が可能な程度の活性が維持されていることをいうものとする。このような「等価配列」は具体的に実施例 11-23 において *Sulfolobus*

solfataricus KM1 株と

Sulfolobus acidocaldarius
ATCC 33909 株の 2 株の間で、新規アミラーゼの相同性がアミノ酸配列レベルでギャップを考慮して計算した場合 59% であっても、同一の活性が保持されていることから、配列番号 6 または 8 に示される配列を参照すれば、当業者であれば格別の困難性なしに選択し、製造可能であることは明らかである。

さらに、本発明の別の態様によれば、この配列番号 6 に示されるアミノ酸配列の N 末端に *Met* が更に付加さ

れたアミノ酸配列が更に提供される。本発明による新規アミラーゼはその天然型において配列番号6に示される配列を有していた。しかしながら、後記するように単離されたその遺伝子情報から、その配列を利用して遺伝子組換えの手法により新規アミラーゼを得た場合、配列番号6のアミノ酸配列のN末端に更にM e tが付加したものが得られることがわかる。更にこの配列が新規アミラーゼ活性を有することは明らかであり、よって、このM e tが付加したアミノ酸配列も本願発明に包含される。

後記する実施例II-24において明らかにされているように、配列番号7に示される1393番から2116番までの配列を有するDNA断片が、このDNA断片の起源である*Sulfolobus*

acidocaldarius ATCC 33909株

または*Sulfolobus*

solfataricus KM1株以外の他の菌株由来のDNA断片とハイブリッドを形成している。一方、上記したように、これらの菌株から性質の酷似した新規アミラーゼの存在を今般確認した。また後記する実施例II-23において明らかにされるように、

Sulfolobus solfataricus

KM1株と*Sulfolobus*

acidocaldarius ATCC 33909株

の2株の間で、新規アミラーゼのアミノ酸配列の相同性

はギャップを考慮して計算した場合 59% である。従って、配列番号 6 または 8 に示されるアミノ酸配列とある程度の相溶性ある配列において、新規アミラーゼ活性が保持されうることは当業者に明らかであるといえる。

なお、配列番号 6 および 8 に示されるアミノ酸配列と相溶性を有する配列の存在について、アミノ酸配列データベース (Swiss prot、および NBRF - PFB) を通じて、配列解析ソフトジェネティックス (ソフトウェア開発) を用いて調べた結果、そのような配列は存在しないことを本発明者らは確認している。

新規アミラーゼをコードする遺伝子の発現

本発明による新規アミラーゼをコードする DNA 断片を、宿主細胞内で複製可能でかつ同遺伝子が発現可能な状態で含む DNA 分子、特に発現ベクター、の形態として宿主細胞の形質転換を行えば、宿主細胞において本発明による新規アミラーゼを産生させることができる。

従って、本発明によれば、さらに本発明による新規アミラーゼをコードする遺伝子を含んだ DNA 分子、特に発現ベクター、が提供される。この DNA 分子は、ベクター分子に本発明による新規アミラーゼをコードする DNA 断片を組み込むことによって得ることが出来る。本発明の好ましい態様によれば、このベクターはプラスミドである。

この本発明による DNA 分子の作成は前掲の

M o l e c u l a r C l o i n g : A

L a b o r a t o r y M a n u a l に記載の方法に準じて行うことができる。

本発明において利用されるベクターは、使用する宿主細胞の種類を勘案しながら、ウイルス、プラスミド、コスミドベクターなどから適宜選択することができる。例えば、宿主細胞が大腸菌の場合は λ ファージ系のバクテリオファージ、pBR、pUC系のプラスミド、枯草菌の場合はpUB系のプラスミド、酵母の場合はYEp、YCP系のベクターが挙げられる。

このプラスミドは形質転換体の選択マーカを含むのが好ましく、選択マーカとしては薬剤耐性マーカ、栄養要求マーカ遺伝子を使用することができる。

さらに、本発明による発現ベクターとしてのDNA分子は、新規アミラーゼ遺伝子の発現に必要なDNA配列、例えばプロモーター、転写開始信号、リボゾーム結合部位、翻訳停止シグナル、転写終結信号などの転写調節信号、翻訳調節信号などを有しているのが好ましい。

プロモーターとしては、挿入断片に含まれる宿主中でも機能することができるプロモーターはもちろんのこと、大腸菌においてはラクトースオペロン(lac)、トリプトファンオペロン(trp)等のプロモーター、酵母ではアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子(ADH)、酸性フォスファターゼ遺伝子(PHO)、ガラクトース遺

伝子 (G A L)、グリセロアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (G P D) 等のプロモーターが好ましく用いることができるものとして挙げられる。

ここで、配列番号 5 に示される塩基配列の 1 番から 2 6 9 1 番までの塩基配列および配列番号 7 に示される塩基配列の 1 番から 3 6 0 0 番までの塩基配列は大腸菌において新規アミラーゼを効率よく発現させる。よって、この配列番号 5 および 7 に示される塩基配列は、少なくとも大腸菌における発現に必要な配列を含んでいると思われることから、この配列をそのまま利用するのも好ましい。

また、宿主細胞が枯草菌、酵母の場合には、分泌型ベクターを使用して、菌体外に新規アミラーゼを分泌することも有利である。

宿主細胞としては、大腸菌の他に、枯草菌、酵母、高等真核生物を用いることができる。枯草菌としては例えば *B a c i l l u s* 属に属する微生物を用いることが好ましい。該属には、タンパク質を多く菌体外へ分泌する株が存在することが知られている。従って、分泌型ベクターを用いることにより、培養液中に多量の組換え新規アミラーゼを分泌させることが出来る。さらに培養上清からの精製も容易となるので好ましい。また、該属には菌体外にプロテアーゼをほとんど分泌しない株も知られており、このような株を用いることにより、本発明による

組換え新規アミラーゼを効率よく生産することが出来るので好ましい。また、宿主細胞としてグルコアミラーゼを産生しない生物を選択すると、菌体抽出液、または簡単な精製を行った粗酵素の状態で本発明による組換え新規アミラーゼを得て、それをそのまま後記する α 、 α -トレハロースの製造に用いることができるので、極めて有利である。

前記した形質転換体の産生する組換え新規アミラーゼは、次のようにして得ることが出来る。まず上記の宿主細胞を適切な条件下で培養し、得られた培養物から公知の方法、例えば遠心分離により菌体を得て、これを適切な緩衝液中に懸濁し、凍結融解、超音波処理、磨砕等により菌体を破砕し、遠心分離またはろ過により組換え新規アミラーゼを含有する菌体抽出物を得る。

この菌体抽出物に存在する組換え新規アミラーゼの精製には、公知の分離、精製法を適当に組み合わせて行うことができる。例えば、熱処理のような耐熱性の差を利用する方法、塩沈澱および溶媒沈澱のような溶解性の差を利用する方法、透析、限外ろ過、ゲルろ過およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のような分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーのような電荷の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーのような特異的親和性を利用する方法、疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーのような

疎水性の差を利用する方法、更に等電点電気泳動のような等電点の差を利用する方法等が挙げられる。この組換え新規アミラーゼは耐熱性を有するため、熱処理により宿主のタンパク質を変性させることにより、これを沈澱として除去できるため、精製を非常に簡単に行うことができる。

組換え体を用いた α , α -トレハロースの製造

本発明によれば、上記の組換え新規アミラーゼと、前記した組換え新規トランスフェラーゼを用いた、 α , α -トレハロースの製造法が提供される。

α , α -トレハロースの製造法の好ましい態様によれば、本発明による組換え新規アミラーゼと、組換え新規トランスフェラーゼは同時にデンプン、デンプン分解物、マルトオリゴ糖等の糖と、混合され、接触されてよい。また、組換え新規トランスフェラーゼ及び組換え新規アミラーゼのいずれか一方を天然由来の酵素に置き換えることも好ましい。

デンプン、デンプン分解物、マルトオリゴ糖等の糖の使用濃度は、用いる糖が溶解されうる範囲であれば、本酵素の比活性、反応温度等を考慮して適宜選択されて良いが、0.5～70%の範囲とするのが一般的であり、好ましくは5～40%の範囲である。糖と酵素との反応における反応温度及びpH条件は本発明による組換え新規アミラーゼ、および組換え新規トランスフェラーゼの

最適条件で行うことが好ましい。よって50～85℃程度、pH 3.5～8程度が一般的であり、好ましくは60～75℃、pH 4.5～6.0の範囲である。

また高重合度のデンプン、デンプン分解物等の糖においては、補助的にエンド型液化アミラーゼ、枝切り酵素を用いることにより α 、 α -トレハロースの生成を促進させることができる。このようなエンド型液化アミラーゼとしては、例えば、*Bacillus*属等のバクテリア、*Aspergillus*属等のかび、麦芽等の植物由来の酵素等が利用できる。また枝切り酵素については例えば*Bacillus*属、*Klebsiella*属等バクテリア由来のプルラーゼ、*Pseudomonas*属由来のイソアミラーゼ等が利用できる。更にこれらの酵素を組み合わせで使用することも可能である。

ただし、過剰量のエンド型液化アミラーゼの添加は新規トランスフェラーゼによって利用されないグルコース、マルトースを生成する。またプルラーゼにおいても同様に過剰量の添加は α -1,6結合の切断による基質の溶解度の低下を引き起こし利用されない高粘度の不溶物を生じる。よってこの際に用いるエンド型液化アミラーゼおよびプルラーゼの量は過剰のグルコース、マルトース、または不溶物を生成しないよう調節されるのが好ましい。

また、プルラーゼを用いる場合は、基質をあらかじめ

めプルラーゼにて前処理する方法、または α 、 α -トレハロースの生成反応に際していずれかの段階で組換え新規アミラーゼおよび新規トランスフェラーゼとを共存させて用いる方法のいずれであってもよい。

生成された α 、 α -トレハロースは、反応液を公知の方法に従い精製することによって得ることが出来る。例えば、得られた反応液をイオン交換樹脂により脱塩し、活性炭、イオン交換樹脂（H S O 3 型）、または陽イオン交換樹脂（C a 型）等を分離剤とするクロマトグラフィーによって目的の糖画分を分離し、または更に続いて濃縮し、結晶化させることにより、高純度の α 、 α -トレハロースを得ることができる。

以下に、具体的な実施例を示し、本発明をより詳細に説明するが、本発明がこれらの実施例に制限されないことは言うまでもない。

実施例 I - 1 古細菌のグルコシルトレハロース生成活性

下記の第3表に示す菌株についてグルコシルトレハロース生成活性を調べた。方法としては、各菌株の培養菌体を超音波破碎処理、遠心分離を行い、その上清に基質であるマルトリオースを最終的に10%となるように加え、60℃で24時間反応後、100℃で5分間加熱処理して反応を停止させた後、生成したグルコシルトレハロースを、以下に示す条件のHPLC分析法により測

定した。

カラム : TOSOH TSK-gel Amide-80 (4.6 × 250mm)

溶媒 : 75% アセトニトリル

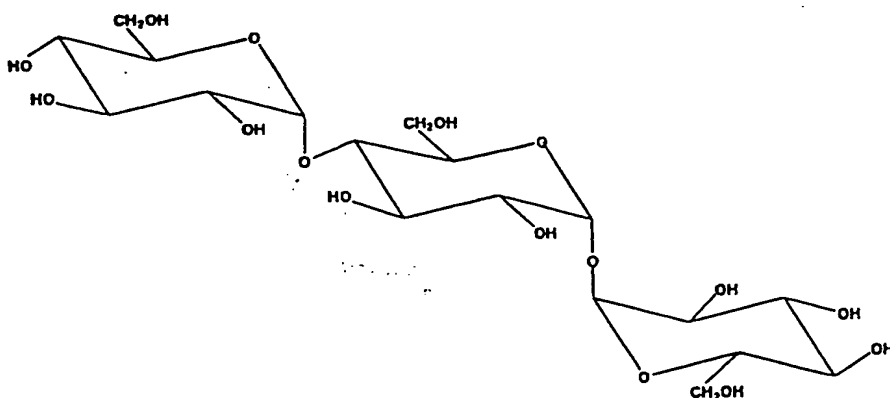
流速 : 1.0 ml/min

温度 : 室温

検出器 : 示差屈折計

酵素活性は、マルトリオースを1時間に1 μmol のグルコシルトレハロースに変換する酵素活性を1ユニットとして示した。但し、第3表においては菌体g当りの活性として示した。

そのHPLCチャートは図1(B)に示す通りである。図に示すように、主反応物はHPLCチャート上ではアノマーのない一本のピークとして、未反応基質よりやや遅れて現れた。なお、この主生成物をTSK-gel amide-80 HPLC column にて分取し、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ により解析の結果、グルコシルトレハロースであることを確認した。化学式は以下の通りである。



その結果、*Sulfolobales* 目に属する菌株の細胞抽出液はグルコシルトレハロース生成活性、即ち、本酵素トランスフェラーゼ活性を有することがわかった。

第 3 表

菌株名		酵素活性 (Units/g-cell)
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	ATCC 35091	6. 8
	ATCC 35092	6. 0
	DSM 5354	13. 0
	DSM 5833	5. 6
	KM1	13. 5
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	ATCC 33909	13. 0
	ATCC 49426	2. 4
<i>Sulfolobus shibatae</i>	DSM 5389	12. 0
<i>Acidianus brierleyi</i>	DSM 1651	6. 7

実施例 I - 2 *Sulfolobus*

solfataricus KM1 株由来の本酵素トランスフェラーゼの精製

Sulfolobus solfataricus
 KM1 株を、2 g / リットルの可溶性デンプン及び 2 g / リットルの酵母エキスを含む
 American Type Culture
 Collection (ATCC) 発行

C a t a l o g u e o f B a c t e r i a a n d
P h a g e s 18 版 (1 9 9 2) に記載の培地番号
1 3 0 4 の培地で 7 5 °C、3 日間培養した。遠心分離に
より集菌し、- 8 0 °C にて保存した。菌体の収率は
3 . 3 g / リットルであった。

上記のようにして得られた菌体 2 0 0 g を 5 m M の
E D T A を含む 5 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H
5 . 5) 4 0 0 m l に懸濁し、0 °C で 1 5 分間、超音波
破碎処理により溶菌し、次に遠心分離を行い上清溶液を
得た。これに硫安を 6 0 % 飽和となるように加えた。

遠心分離して得られた沈澱を 1 M の硫安、5 m M の
E D T A を含む 5 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H
5 . 5) に溶解し、同緩衝液にて平衡化した疎水クロマ
トグラフィー (カラム : T O S O H T S K - g e l P h e n y l -
T O Y O P E A R L 6 5 0 S 8 0 0 m l) に通した。カラムを同緩
衝液にて洗浄し、次に 6 0 0 m l の 1 M ~ 0 M 硫安の線
状勾配で標的トランスフェラーゼを溶離した。活性画分
を限外濾過膜 (分子量カット 1 3 0 0 0) にて濃縮し、
引き続き 1 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 5 . 5)
にて洗浄、脱塩した。

次いで同緩衝液にて平衡化したイオン交換クロマトグ
ラフィー (カラム : T O S O H T S K - g e l D E A E - T O Y O P E A R L 6 5 0
S 3 0 0 m l) に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、
引き続き 9 0 0 m l の 0 M ~ 0 . 3 M 食塩の線状勾配で

標的トランスフェラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 0.15 M の食塩、5 mM の EDTA を含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）にて洗浄、脱塩した。

次に脱塩濃縮液をゲル濾過クロマトグラフィー（カラム：Pharmacia HiLoad 16/60 Superdex 200pg）に載せ、同緩衝液にて標的トランスフェラーゼを溶出した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）にて洗浄、脱塩した。

次に脱塩濃縮液に 1 M となるよう硫安を溶解し、同緩衝液にて平衡化した疎水クロマトグラフィー（カラム：TOSOH TSK-gel Phenyl-5PW HPLC）に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次いで 30 ml の 1 M ~ 0 M 硫安の線状勾配で標的トランスフェラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）にて洗浄、脱塩した。

次に同緩衝液にて平衡化したイオン交換クロマトグラフィー（カラム：TOSOH TSK-gel DEAE 5PW HPLC）に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次いで 30 ml の 0 M ~ 0.3 M 食塩の線状勾配で標的トランスフェラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮した。

最終的にネイティブポリアクリルアミドゲル、S D S ポリアクリルアミドゲル、及び等電点電気泳動にて単一バンドを示す精製酵素を得た。

なお、活性測定は、実施例 I - 1 と同様に行った。

各精製ステップにおける総酵素活性、総蛋白量、比活性を以下の第 4 表に示す。

第 4 表

精製画分	総酵素活性 (Units)	総蛋白量 (mg)	比活性 (Units/mg)	回収率 (%)	精製度 (倍)
抽出上清	653	17000	0.038	100	1
60% 硫酸沈澱	625	15000	0.04	95.7	1.1
Phenyl	83	533	0.16	12.7	4.2
DEAE	150	31	4.90	23.0	129
ゲル濾過	111	2	55.7	17.0	1466
Phenylリクロマト	48	0.17	277	7.4	7289
DEAEリクロマト	30	0.05	598	4.6	15737

実施例 I - 3 S u l f o l o b u s

s o l f a t a r i c u s D S M 5 8 3 3 株由来の本
酵素トランスフェラーゼの精製

S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
D S M 5 8 3 3 株を、2 g / リットルの可溶性デンプン
及び 2 g / リットルの酵母エキスを含む
A m e r i c a n T y p e C u l t u r e

C o l l e c t i o n (A T C C) 発 行

C a t a l o g u e o f B a c t e r i a a n d
P h a g e s 1 8 版 (1 9 9 2) に記載の培地番号
1 3 0 4 の培地で7 5 °C、3日間培養した。遠心分離に
より集菌し、- 8 0 °Cにて保存した。菌体の収率は
1 . 7 g / リットルであった。

上記のようにして得られた菌体5 6 gを5 m Mの
E D T Aを含む5 0 m M酢酸ナトリウム緩衝液 (p H
5 . 5) 1 0 0 m l に懸濁し、0 °Cで1 5 分間、超音波
破碎処理により溶菌し、次に遠心分離を行い上清溶液を
得た。

次に上清溶液に1 Mとなるよう硫酸を溶解し、1 Mの
硫酸、5 m MのE D T Aを含む5 0 m M酢酸ナトリウム
緩衝液 (p H 5 . 5) にて平衡化した疎水クロマトグラ
フィー (カラム : T O S O H T S K - g e l P h e n y l - T O Y O P E A R L 6 5 0
S 2 0 0 m l) に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、
次いで6 0 0 m l の1 M ~ 0 M硫酸の線状勾配で標的ト
ランスフェラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜
(分子量カット1 3 0 0 0) にて濃縮し、引き続き1 0
m Mトリス塩酸緩衝液 (p H 7 . 5) にて洗浄、脱塩し
た。

次に同緩衝液にて平衡化したイオン交換クロマトグラ
フィー (カラム : T O S O H T S K - g e l D E A E - T O Y O P E A R L 6 5 0 S
3 0 0 m l) に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、

次いで900 mlの0 M ~ 0.3 M食塩の線状勾配で標的トランスフェラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット13000）にて濃縮し、引き続き5 mMのEDTAを含む50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）にて洗浄、脱塩した。

次に脱塩濃縮液に1 Mとなるよう硫安を溶解し、同緩衝液にて平衡化した疎水クロマトグラフィー（カラム：TOSOH TSK-gel Phenyl-TOYOPEARL 650S 200 ml）に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次いで600 mlの1 M ~ 0 M硫安の線状勾配で標的トランスフェラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット13000）にて濃縮し、引き続き0.15 Mの食塩、5 mMのEDTAを含む50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）にて洗浄、脱塩した。

次に脱塩濃縮液をゲル濾過クロマトグラフィー（カラム：Pharmacia HiLoad 16/60 Superdex 200pg）に載せ、同緩衝液にて標的トランスフェラーゼを溶出した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット13000）にて濃縮し、引き続き25 mM ビス - トリス HCl 緩衝液（pH 6.7）にて透析した。

次に同緩衝液にて平衡化したクロマトフォーカシング（カラム：ファルマシア Mono P HR/5/20）に通した。サンプルを注入後、直ちに10%ポリバッファー74 HCl（pH 5.0ファルマシア社製）にて標的トラン

スフェラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 25 mM ビス - トリス HCl 緩衝液（pH 6.7）にて透析した。

さらに同様の条件にてクロマトフォーカシングを行い、標的トランスフェラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 5 mM の EDTA を含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）にて洗浄、脱塩した。

最終的にネイティブポリアクリルアミドゲル、SDS ポリアクリルアミドゲル、及び等電点電気泳動にて単一バンドを示す精製酵素を得た。

なお、活性測定は、実施例 I - 1 と同様に行った。

各精製ステップにおける総酵素活性、総蛋白量、比活性を以下の第 5 表に示す。

第 5 表

精製画分	総酵素活性 (Units)	総蛋白量 (mg)	比活性 (Units/mg)	回収率 (%)	精製度 (倍)
抽出上清	541	10000	0.06	100	1
Phenyl	1039	988	1.05	192	19
DEAE	383	147	2.60	70.7	47
Phenylリクロマト	248	49.5	5.00	45.8	91
ゲル濾過	196	3.69	53.0	36.1	964
Mono P	92	0.32	287	17.0	5218
Mono Pリクロマト	64	0.13	494	11.9	8982

実施例 I - 4 S u l f o l o b u sa c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9株由来の本酵素トランスフェラーゼの精製

S u l f o l o b u s

a c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9

株を、2 g / リットルの可溶性デンプン及び2 g / リットルの酵母エキスを含む American Type Culture Collection (ATCC) 発行 Catalogue of Bacteria and Phages 18 版 (1992) に記載の培地番号 1304 の培地 (pH 3.0) で 75℃、3 日間培養した。遠心分離により集菌し、-80℃にて保存した。菌体の収率は 2.9 g / リットルであった。

上記のようにして得られた菌体 92.5 g を 5 mM の EDTA を含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) 200 ml に懸濁し、0℃で 15 分間、超音波破碎処理により溶菌し、次いで遠心分離を行い上清溶液を得た。

次に上清溶液に 1 M となるよう硫酸を溶解し、1 M の硫酸、5 mM の EDTA を含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) にて平衡化した疎水クロマトグラフィー (カラム: TOSOH TSK-gel Phenyl-TOYOPEARL 650 S 400 ml) に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次いで 600 ml の 1 M ~ 0 M 硫酸の線状勾配で標的ト

ランスフェラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 10 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.5）にて洗浄、脱塩した。

次に同緩衝液にて平衡化したイオン交換クロマトグラフィー（カラム：TOSOH TSK-gel DEAE-TOYOPEARL 650S 300 ml）に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次いで 900 ml の 0 M ~ 0.3 M 食塩の線状勾配で標的トランスフェラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 5 mM の EDTA を含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）にて洗浄、脱塩した。

次に脱塩濃縮液に 1 M となるよう硫酸を溶解し、同緩衝液にて平衡化した疎水クロマトグラフィー（カラム：TOSOH TSK-gel Phenyl-TOYOPEARL 650S 200 ml）に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次いで 600 ml の 1 M ~ 0 M 硫酸の線状勾配で標的トランスフェラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 0.15 M の食塩、5 mM の EDTA を含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）にて洗浄、脱塩した。

次に脱塩濃縮液をゲル濾過クロマトグラフィー（カラム：Pharmacia HiLoad 16/60 Superdex 200pg）に載せ、同緩衝液にて標的トランスフェラーゼを溶出した。活性

画分をを限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 25 mM ビス-トリス HCl 緩衝液（pH 6.7）にて透析した。

次に同緩衝液にて平衡化したクロマトフォーカシング（カラム：ファルマシア Mono P HR/5/20）に通した。サンプルを注入後、直ちに 10% ポリバッファー 74 HCl（pH 5.0 ファルマシア社製）にて標的トランスフェラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 25 mM ビス-トリス HCl 緩衝液（pH 6.7）にて透析した。

さらに同様の条件にてクロマトフォーカシングを行い、標的トランスフェラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 5 mM の EDTA を含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）にて洗浄、脱塩した。

最終的にネイティブポリアクリルアミドゲル、SDS ポリアクリルアミドゲル、及び等電点電気泳動にて単一バンドを示す精製酵素を得た。

なお、活性測定は、実施例 I-1 と同様に行った。

各精製ステップにおける総酵素活性、総蛋白量、比活性を以下の第 6 表に示す。

第 6 表

精製画分	総酵素活性 (Units)	総蛋白量 (mg)	比活性 (Units/mg)	回収率 (%)	精製度 (倍)
抽出上清	912	38000	0.24	100	1
Phenyl	559	660	0.85	61.3	3.5
DEAE	806	150	5.40	88.4	23
Phenylリクロマト	636	35.1	18.1	69.7	75
ゲル濾過	280	2.68	104	30.7	433
Mono P	126	0.35	411	13.8	1713
Mono Pリクロマト	86.9	0.24	362	9.5	1508

実施例 I - 5 A c i d i a n u s

b r i e r l e y i D S M 1 6 5 1 株由来の本酵素
トランスフェラーゼの精製

A c i d i a n u s b r i e r l e y i D S M
1 6 5 1 株を、D e u t s c h e S a m m l u n g
v o n M i k r o o r g a n i s m e n u n d
Z e l l k u l t u r e n G m b H (D S M) 発行
C a t a l o g u e o f S t r a i n s 5 版

(1 9 9 3) に記載の培地番号 1 5 0 の培地で 7 0 ° C 、
3 日間培養した。遠心分離により集菌し、- 8 0 ° C にて
保存した。菌体の収率は 0 . 6 g / リットルであった。

上記のようにして得られた菌体 1 2 g を 5 m M の
E D T A を含む 5 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H

5. 5) 120 ml に懸濁し、0℃で15分間、超音波破碎処理により溶菌し、次いで遠心分離を行い上清溶液を得た。

次に上清溶液に1Mとなるよう硫酸を溶解し、1Mの硫酸、5mMのEDTAを含む50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5)にて平衡化した疎水クロマトグラフィー(カラム: TOSOH TSK-gel Phenyl-TOYOPEARL 650S 200 ml)に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次いで600 mlの1M~0M硫酸の線状勾配で標的トランスフェラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜(分子量カット13000)にて濃縮し、引き続き10mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5)にて洗浄、脱塩した。

次に同緩衝液にて平衡化したイオン交換クロマトグラフィー(カラム: TOSOH TSK-gel DEAE-TOYOPEARL 650S 300 ml)に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次いで900 mlの0M~0.3M食塩の線状勾配で標的トランスフェラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜(分子量カット13000)にて濃縮し、引き続き0.15Mの食塩、5mMのEDTAを含む50mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5)にて洗浄、脱塩した。

次に脱塩濃縮液をゲル濾過クロマトグラフィー(カラム: Pharmacia HiLoad 16/60 Superdex 200pg)に載せ、同緩衝液にて標的トランスフェラーゼを溶出した。活性

画分をを限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 25 mM ビス-トリス HCl 緩衝液（pH 6.7）にて透析した。

次に同緩衝液にて平衡化したクロマトフォーカシング（カラム：ファルマシア Mono P HR5/20）に通した。サンプルを注入後、直ちに 10% ポリバッファー 74 HCl（pH 5.0 ファルマシア社製）にて標的トランスフェラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 5 mM の EDTA を含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）にて洗浄、脱塩した。

最終的にネイティブポリアクリルアミドゲル、SDS ポリアクリルアミドゲル、及び等電点電気泳動にて単一バンドを示す精製酵素を得た。

なお、活性測定は、実施例 I-1 と同様に行った。

各精製ステップにおける総酵素活性、総蛋白量、比活性を以下の第 7 表に示す。

第 7 表

精製画分	総酵素活性 (Units)	総蛋白量 (mg)	比活性 (Units/mg)	回収率 (%)	精製度 (倍)
抽出上清	310	264	1.17	100	1
Phenyl	176	19.2	9.20	56.9	7.9
DEAE	70	5.02	13.8	22.5	12
ゲル濾過	54	0.18	298	17.3	255
Mono P	27	0.07	378	8.6	323

実施例 I - 6 本酵素トランスフェラーゼの諸性質の検討

実施例 I - 2 で得られた精製酵素の酵素学的諸性質を測定した。

(1) 分子量

ネイティブな状態での精製酵素の分子量測定は、ゲル濾過クロマトグラフィー（カラム：Pharmacia HiLoad 16/60 Superdex 200 pg）により行った。マーカートンパック質として分子量 200,000；97,400；68,000；43,000；29,000；18,400；14,300 のものを用いた。

その結果、該トランスフェラーゼの分子量は 54,000 であった。

ゲル濃度 6% の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分子量測定を行った。マーカートンパック質として分子量 200,000；116,300；97,400；66,300；55,400；36,500；31,000；21,500；14,400 のものを用いた。

その結果、該トランスフェラーゼの分子量は 76,000 であった。

ゲル濾過クロマトグラフィーと SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動における分子量の測定値に相違が見られたが、これは多分、ゲル濾過カラムの充填剤とタンパ

ク質との間に何らかの相互作用が働くためではないかと考えられる。よって、ゲル濾過による分子量の値は本酵素のネイティブな状態での分子量を示しているとは必ずしもいえない。

(2) 等電点

アガロースゲル等電点電気泳動の結果、等電点は 6.1 であった。

(3) 安定性

得られた精製酵素の各温度、各 pH における安定性を、それぞれ図 2、図 3 に示す。測定は、pH 3～5 の間はグリシン塩酸系緩衝液を、pH 4～6 の間は酢酸ナトリウム系緩衝液を、pH 5～8 の間は磷酸ナトリウム系緩衝液を、pH 8～9 の間はトリス塩酸系緩衝液を、pH 9～10 の間は炭酸水素ナトリウム系緩衝液を、pH 11～13 の間は KCl-NaOH 系緩衝液をそれぞれ用いた。

本酵素は 85℃ で 6 時間の処理で安定であり、また pH 4.0～10.0 の室温 6 時間の処理で安定であった。

(4) 反応性

得られた精製酵素の各温度、各 pH における反応性を、それぞれ図 4、図 5 に示す。測定は、pH 3～5 の間はグリシン塩酸系緩衝液 (□) を、pH 4～5.5 の間は酢酸ナトリウム系緩衝液 () を、pH 5～7.5 の間

は磷酸ナトリウム系緩衝液（△）を、pH 8～9の間はトリス塩酸系緩衝液（◇）をそれぞれ用いた。

本酵素は60～80℃付近に反応最適温度、pH 5.0～6.0付近に反応最適pHを有する。

（5）各種活性化剤、阻害剤の影響

実施例 I - 1 のグルコシルトレハロース生成活性の測定法において以下の第8表に示す物質を基質と共に添加し、それぞれの場合の活性測定を実施例 I - 1 と同様に行い、活性化又は阻害の有無を調べた。その結果、銅イオン、SDSにて阻害を受けることがわかった。糖関連酵素ではカルシウムイオンによって活性化される場合が多く認められるが、本酵素ではカルシウムイオンによって活性化されない。

第 8 表

活性化剤／阻害剤	濃度 (mM)	無添加に対する 相対活性
control (無添加)		100.0
CaCl_2	5	93.6
MgCl_2	5	111.3
MnCl_2	5	74.2
CuSO_4	5	0.0
CoCl_2	5	88.5
FeSO_4	5	108.3
FeCl_3	5	90.0
AgNO_3	5	121.0
EDTA	5	96.8
メルカプトエタノール	5	100.3
ジチオスレイトール	5	84.5
SDS	5	0.0
グルコース	0.5	107.3
トレハロース	0.5	107.8
マルトテトラオース	0.5	97.4
マルトペンタオース	0.5	101.9
マルトヘキサオース	0.5	91.0
マルトヘプタオース	0.5	93.5

(6) 基質特異性

本精製酵素を以下の第9表に示す基質に作用させて、 $\alpha-1$, $\alpha-1$ 転移体の生成の有無を調べた。なお、活性測定は実施例 I-1 と同様に行った。

第 9 表

基質	反応性
グルコース	-
マルトース	-
マルトトリオース (G3)	+
マルトテトラオース (G4)	++
マルトペンタオース (G5)	++
マルトヘキサオース (G6)	++
マルトヘプタオース (G7)	++
イソマルトトリオース	-
イソマルトテトラオース	-
イソマルトペンタオース	-
パノース	-

その結果、本精製酵素に関しては、マルトトリオース (G3) ~ マルトヘプタオース (G7) からトレハロースオリゴ糖の生成が確認された。また、 $\alpha-1$, 6 結合を還元末端から1つ目~4つ目、又は2つ目に有するイソマルトトリオース、イソマルトテトラオース、イソマ

ルトペンタオース、パノースに対してはいずれも反応しなかった。

なお、実施例 I - 3 ~ I - 5 で得た

Sulfolobus solfataricus DSM 5833 株、*Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 株、*Acidianus briarleyi* DSM 1651 株由来の各精製酵素についても同様の方法により酵素学的性質を調べ、その結果を前記した第 1 表に示した。

実施例 I - 7 マルトオリゴ糖からのグルコシルトレハロース及びマルトオリゴシルトレハロースの製造

基質を 100 mM のマルトトリオース (G3) ~ マルトヘプタオース (G7) とし、実施例 I - 2 で得られた精製酵素 13.5 Units/ml (マルトトリオースを基質として作用させたときの酵素活性) をそれぞれ作用させ、対応する α -1, α -1 転移体を生成させた。各生成物の分析法は実施例 I - 1 の方法により行い、その収率及び酵素活性を調べた。なお、第 10 表中での酵素活性は、各マルトオリゴ糖を 1 時間に 1 μ mol の対応する α -1, α -1 転移体に変換する酵素活性を 1 ユニットとして示した。結果は以下の第 10 表に示した通りである。

第10表

基質	酵素活性	収率
	(Units/ml)	(%)
マルトトリオース (G3)	13.5	44.6
マルトテトラオース (G4)	76.3	73.1
マルトペンタオース (G5)	111.3	68.5
マルトヘキサオース (G6)	100.9	63.5
マルトヘプタオース (G7)	70.5	68.7

表の結果より、基質はG5の時、最も活性が高く、G3のおよそ8倍を示した。また、収率はG3の場合44.6%であるが、G4以上では63.5~73.1%であった。

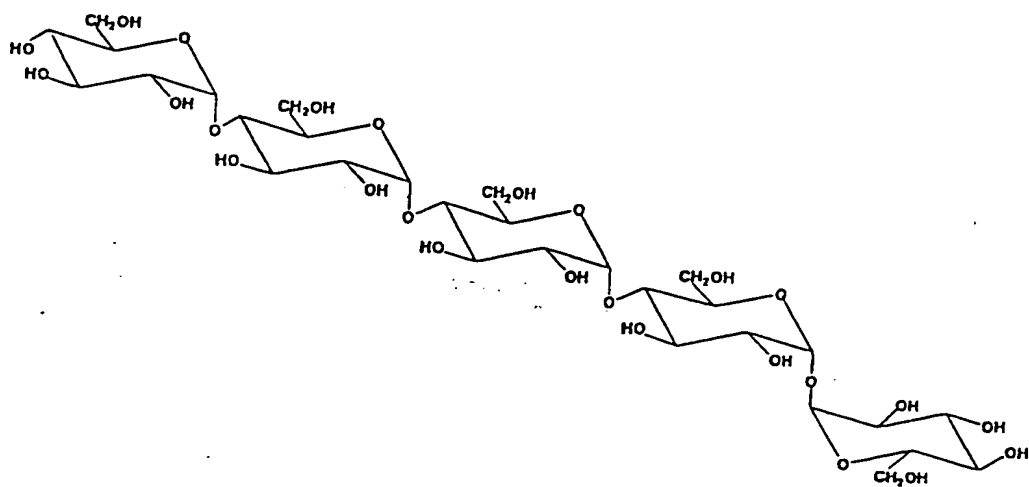
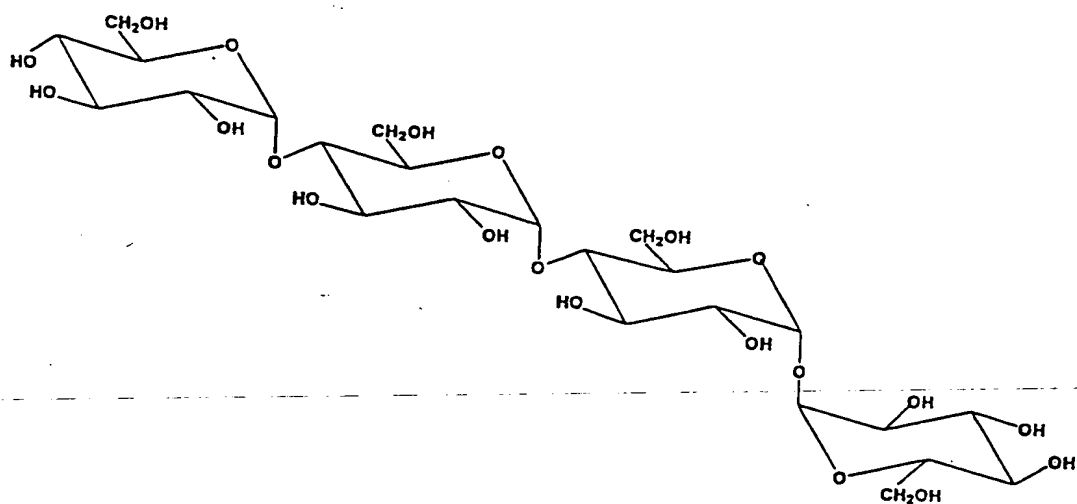
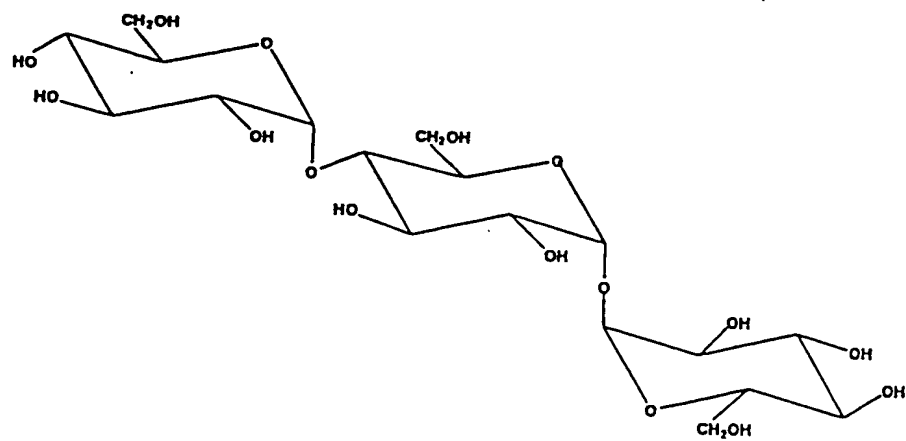
また、G3、G4、及びG5を基質として得られた反応生成物の組成を調べたところその結果は、それぞれ図6~8に示した通りであった。

すなわち、マルトトリオースを基質として用いた場合、主反応であるグルコシルトレハロースの生成とともに、副反応として等モルずつのマルトース及びグルコースが生成された。

マルトテトラオース以上の重合度nを持つ糖を基質として用いた場合では、主反応としてまず還元末端のグルコース単位が $\alpha-1$, $\alpha-1$ 結合した重合度nの糖が生成され、同様に副反応として等モルずつの重合度(n-

1) 糖及びグルコースが生成された。さらにこれらの糖の反応が進むと、二次的に、重合度 ($n-1$) 糖から同様の反応が進んだ (なお、図 7、8 において 3 糖又は 4 糖と示した糖にはそれぞれ、未反応のマルトトリオース又はマルトテトラオースと、二次的に同様の反応が進み、その末端が $\alpha-1$, $\alpha-1$ 結合した糖が含まれている)。また、重合度 ($n+1$) 以上の糖、すなわち分子間の転移体の生成は認められなかった。なお、副反応である加水分解は鎖長が G 4 以上になると少なくなることが認められた。

これらの主反応物の例として、基質 G 3、G 4、及び G 5 からの主生成物である 3 糖、4 糖、及び 5 糖を TSK-gel amide-80 HPLC column にて分取し、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ により解析を行った。その結果、いずれも還元末端のグルコース残基 1 個が $\alpha-1$, $\alpha-1$ で結合した構造を示し、それぞれグルコシルトレハロース (α -D-マルトシル α -D-グルコピラノシド)、マルトシルトレハロース (α -D-マルトトリオシル α -D-グルコピラノシド)、及びマルトトリオシルトレハロース (α -D-マルトテトラオシル α -D-グルコピラノシド) であることを確認した。これらの化学式はそれぞれ以下の通りである。



以上の結果から、本発明の酵素はグルコースが $\alpha-1, 4$ で結合したマルトトリオース以上のグルコースポリマーの還元末端を、転移により $\alpha-1, \alpha-1$ で結合させる活性を有する酵素であると結論される。また、副反応として、糖転移酵素によく観察されるように、水分子を受容体として加水分解反応し、還元末端側の結合1個を切断してグルコース1分子を遊離することもわかった。

実施例 I - 8 マルトオリゴ糖混合物からのグルコシルトレハロース、マルトオリゴシルトレハロースの製造

実施例 I - 2 で得られた精製酵素 10 Units/ml を用い、基質を可溶性デンプン（ナカライテスク社製、特級品）の α -アミラーゼ分解物（ヨウ素デンプン反応を示さずオリゴ糖にまで分解されたもの：なおここにおいて用いられた α -アミラーゼは、Sigma 社製の A-0273 アスペルギルス・オリゼ由来のもの）とし、グルコシルトレハロース及び各種のマルトオリゴシルトレハロースの製造を試みた。反応液は以下に示す条件下の HPLC 分析法により分析を行った。

カラム： BIORAD AMINEX HPX-42A (7.8 × 300mm)

溶媒 : 水

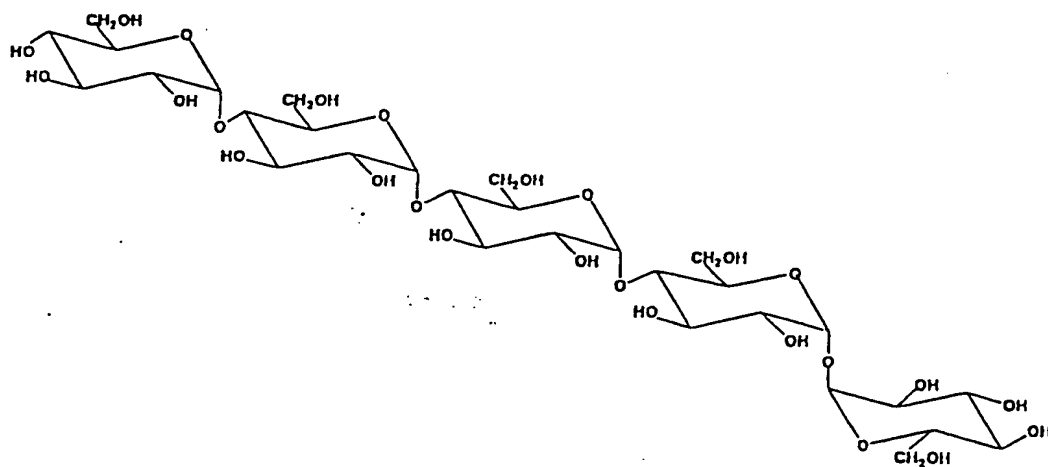
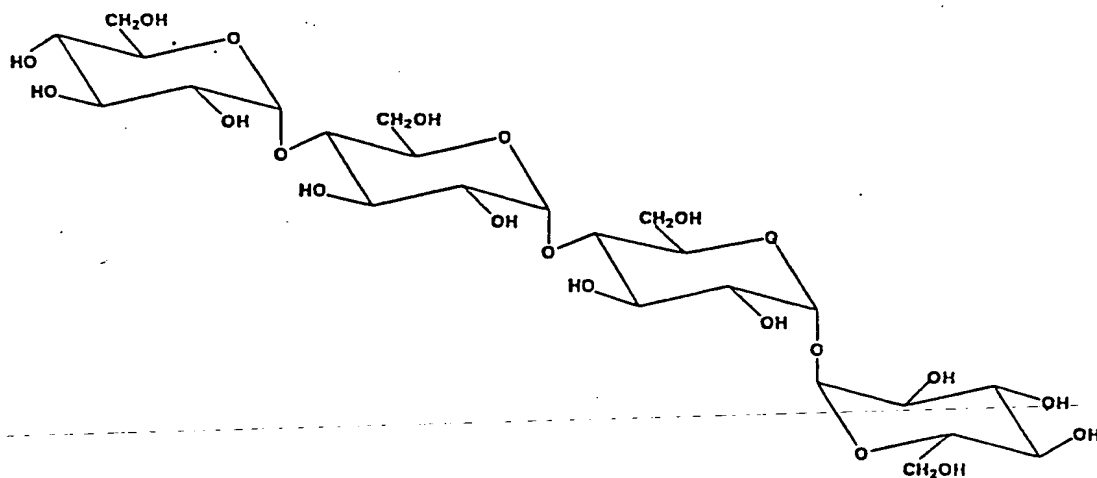
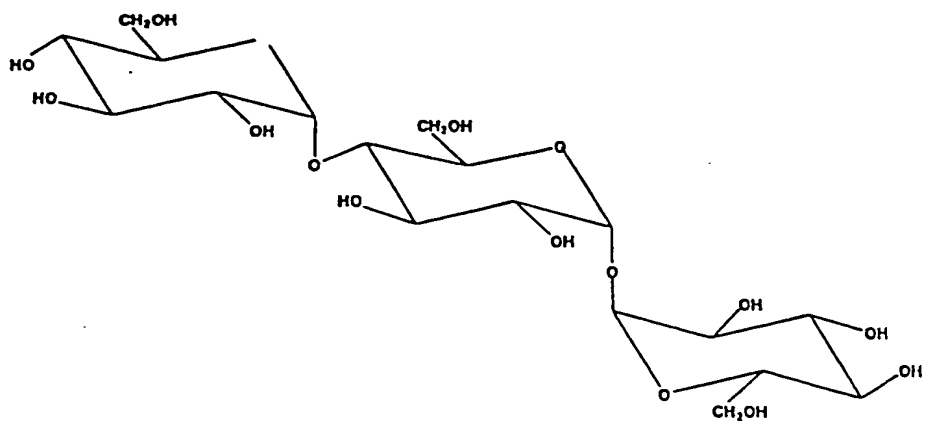
流速 : 0.6 ml/min

温度 : 85 °C

検出器： 示差屈折計

図 9 にその HPLC による分析チャートを示した (A)。

なお対照として、本酵素トランスフェラーゼを添加しない場合の H P L C チャートを示した (B) 。その結果、反応生成物のオリゴ糖類は還元末端が $\alpha - 1$, $\alpha - 1$ に転移されるため、対照のアミラーゼのみによる生成物よりも各々保持時間が短いオリゴ糖類を生じた。これらの反応物の例として、実施例 I - 7 の場合と同様に 3 糖、4 糖、及び 5 糖をそれぞれ分取し、 $^1\text{H} - \text{NMR}$ 、 $^{13}\text{C} - \text{NMR}$ により解析を行ったところ、いずれも還元末端のグルコース残基 1 個が $\alpha - 1$, $\alpha - 1$ で結合した構造を示し、それぞれグルコシルトレハロース ($\alpha - \text{D}$ - マルトシル $\alpha - \text{D}$ - グルコピラノシド)、マルトシルトレハロース ($\alpha - \text{D}$ - マルトトリオシル $\alpha - \text{D}$ - グルコピラノシド)、及びマルトトリオシルトレハロース ($\alpha - \text{D}$ - マルトテトラオシル $\alpha - \text{D}$ - グルコピラノシド)であることを確認した。これらの化学式はそれぞれ以下の通りである。



以下の実施例 II-1 ~ II-14 (比較例 II-1 ~ II-2 及び参考例 II-1 ~ II-4 を含む) において用いた下記の試薬或いは原料は、いずれも下記の製造元から入手したものである。

α , α -トレハロース : Sigma 社製

可溶性デンプン : ナカライテスク社製、特級品

Klebsiella pneumoniae 由来プルラナーゼ : 和光純薬製、
165-15651

パインデックス #1 及びパインデックス #3 : 松谷化学
製

マルトース (G2) : 和光純薬製

マルトトリオース (G3)、マルトテトラオース (G4)、
マルトペンタオース (G5)、マルトヘキサオース

(G6)、マルトヘプタオース (G7)、及びアミロー
ス DP-17 : 林原バイオケミカル製

アミロペクチン : ナカライテスク社製、特級品

イソマルトース : 和光純薬製

イソマルトトリオース : 和光純薬製

イソマルトテトラオース : 生化学工業製

イソマルトペンタオース : 生化学工業製

パノース : 東京化成工業製

実施例 II-1 古細菌のトレハロースオリゴ糖分解活性、
及びデンプン液化活性の測定

下記の第11表に示す菌株について活性を調べた。方

法としては各菌株の培養菌体を超音波破碎処理、遠心分離を行い、その上清を粗酵素液として、これに基質であるマルトリオシルトレハロースを最終的に 10 mM となるように加え、60 °C、pH 5.5 (50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液) で反応後、100 °C で5分間加熱処理して反応を停止させた後、生成した α , α -トレハロースを、以下に示す条件の HPLC 分析法により測定した。

カラム : TOSOH TSK-gel Amide-80 (4.6 × 250 mm)

溶媒 : 72.5 % アセトニトリル

流速 : 1.0 ml/min

温度 : 室温

検出器 : 示差屈折計

トレハロースオリゴ糖分解活性は、マルトリオシルトレハロースから1時間に1 μ mol の α , α -トレハロースを遊離する酵素活性を1 Unit として示した。但し、第11表においては菌体 g 当りの活性として示した。また、マルトリオシルトレハロースの調製は、50 mM 酢酸 (pH 5.5) を含む10% マルトペンタオースに *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の精製トランスフェラーゼを10 Units/ml となるように添加して60 °C で24 hr 反応させた後、上記条件の TSK-gel Amide-80 HPLC column により分取することによって行った。なお、*Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の精製トラン

スフェラーゼの活性は、マルトトリオースを基質として pH 5.5、60℃で1時間に1 μ molのグルコシルトレハロースを生成する酵素活性を1 Unitと定義する。

そのHPLCチャートは図10に示す通りである。図に示すように、HPLCチャート上ではアノマーのない α , α -トレハロースと同一の保持時間を示すピークと、マルトトリオースと同一の保持時間を示すピークが現れた。なお、はじめの生成物をTSK-gel amide-80 HPLC columnにて分取し、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ により解析の結果、 α , α -トレハロースであることを確認した。

また、上記と同じ粗酵素液（上清）を用いて、2%可溶性デンプンを含む100 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）0.5 mlに該上清を適宜希釈して0.5 ml加え、60℃にて反応を行った。経時的にサンプリングを行い、このサンプルに2倍量の1 N塩酸を加えて反応を停止した。次いで2/3倍量の0.01%ヨウ素を含む0.1%ヨウ化カリウム溶液を加え、更に1.8倍量の水を加えた。最後に620 nmの吸光を測定し、その経時変化から活性を測定した。

反応後生成する糖の分析は、100℃で5分間処理して反応を停止させた後、以下に示す条件下HPLC分析法により測定した。

カラム： BIO-RAD AMINEX HPX-42A (7.8 \times 300 mm)

— 112 —

溶媒 : 水
 流速 : 0.6 ml/min
 温度 : 85 °C
 検出器 : 示差屈折計

デンプン分解活性は、デンプン-ヨウ素複合体の青紫色による620nmの吸光を10分に10%減少させる酵素量を1 Unitと定義した。但し、第11表においては菌体g当たりの活性として示した。

第11表

菌株名	酵素活性 (Units/g-cell)	
	デンプン分解 活性	トレハロース オリゴ糖分解 活性
<i>Sulfolobus solfataricus</i> ATCC 35091	13.3	118.0
DSM 5354	13.3	116.8
DSM 5833	8.4	94.9
KM1	13.4	293.2
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> ATCC 33909	12.5	161.8
<i>Sulfolobus shibatae</i> DSM 5389	11.2	281.2

Sulfolobus solfataricus
 KM1株由来の粗酵素液による反応生成物のAMINEX HPX
 -42A HPLCによる分析結果は図11に示す通りであった。

以上の結果、*Sulfolobus*属に属する菌株の

細胞抽出液はトレハロースオリゴ糖を分解し、 α 、 α -トレハロースを遊離する活性及び、デンプンを加水分解して主に単糖及び2糖を遊離する活性を有することがわかった。

実施例 11-2 S u l f o l o b u s

s o l f a t a r i c u s K M 1 株 由 来 の 本 酵 素 ア ミ
ラーゼの精製

S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
K M 1 株を、2 g / リットルの可溶性デンプン及び2 g
/ リットルの酵母エキスを含む A m e r i c a n
T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n
(A T C C) 発行 C a t a l o g u e o f
B a c t e r i a a n d P h a g e s 1 8 版

(1 9 9 2) に記載の培地番号 1 3 0 4 の培地で 7 . 5 ° C 、
3 日間培養した。遠心分離により集菌し、- 8 0 ° C にて
保存した。菌体の収率は 3 . 3 g / リットルであった。

上記のようにして得られた菌体 2 0 0 g を 5 m M の
E D T A を含む 5 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H
5 . 5) 4 0 0 m l に懸濁し、0 ° C で 1 5 分間、超音波
破碎処理により溶菌し、次いで遠心分離を行い上清溶液
を得た。これに硫安を 6 0 % 飽和となるように加えた。

遠心分離して得られた沈澱を 1 M の硫安、5 m M の
E D T A を含む 5 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H
5 . 5) に溶解し、同緩衝液にて平衡化した疎水クロマ

トグラフィー（カラム：TOSOH TSK-gel Phenyl-TOYOPEARL 650S 800 ml）に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次に600 mlの1 M～0 M硫酸の線状勾配で標的アミラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット13000）にて濃縮し、引き続き10 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.5）にて洗浄、脱塩した。

次に同緩衝液にて平衡化したイオン交換クロマトグラフィー（カラム：TOSOH TSK-gel DEAE-TOYOPEARL 650S 300 ml）に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、引き続き900 mlの0 M～0.3 M食塩の線状勾配で標的アミラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット13000）にて濃縮し、引き続き0.15 Mの食塩、5 mMのEDTAを含む50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）にて洗浄、脱塩した。

次に脱塩濃縮液をゲル濾過クロマトグラフィー（カラム：Pharmacia HiLoad 16/60 Superdex 200pg）に載せ、同緩衝液にて標的アミラーゼを溶出した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット13000）にて濃縮し、引き続き25 mM ビスートリス塩酸緩衝液（pH 6.3）にて洗浄、脱塩した。

次にこの脱塩濃縮液を、同緩衝液にて平衡化したクロマトフォーカシング（カラム：Pharmacia Mono P HR5/20）に載せ、10% Polybuffer 74（Pharmacia 製、塩

酸にて pH 4.0 に調製したもの) で標的アミラーゼを溶出した。活性画分を限外濾過膜 (分子量カット 13000) にて濃縮し、引き続き 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.8) にて洗浄、脱塩した。

次にこの脱塩濃縮液に 4 分の 1 量のサンプルバッファー (62.5 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8)、10% グリセロール、2% SDS、0.0125% ブロモフェノールブルー) を加え、10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) (装置: BIO-RAD プレップセル モデル 491) にて標的アミラーゼを溶離した。活性画分を分取し限外濾過膜 (分子量カット 13000) にて濃縮し、引き続き 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) にて洗浄、脱塩した。

最終的にネイティブポリアクリルアミドゲル、SDS ポリアクリルアミドゲル、及び等電点電気泳動にて単一バンドを示す精製酵素を得た。

なお、この精製における活性測定には、基質としてマルトトリオシルトレハロースを用い、その他の方法は実施例 II-1 において示した TSK-gel Amide-80 の HPLC 分析法と同様にして行った。

各精製ステップにおける総酵素活性、総蛋白量、比活性を以下の第 12 表に示す。

第12表

精製画分	総酵素活性 (Units)	総蛋白量 (mg)	比活性 (Units/mg)	回収率 (%)	精製度 (倍)
60% 硫酸沈澱	58640	17000	3.45	100	1
Phenyl	52251	1311	39.9	89	12
DEAE	49284	195	253	84	73
ゲル濾過	2197	26.7	82.2	3.7	24
Mono P	1048	0.40	2640	1.8	765
SDS-PAGE	401	0.08	5053	0.7	1465

実施例 II-3 S u l f o l o b u s

s o l f a t a r i c u s D S M 5 8 3 3 株由来の本
酵素アミラーゼの精製

S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
D S M 5 8 3 3 株を、2 g / リットルの可溶性デンプン
及び 2 g / リットルの酵母エキスを含む
A m e r i c a n T y p e C u l t u r e
C o l l e c t i o n (A T C C) 発行
C a t a l o g u e o f B a c t e r i a a n d
P h a g e s 18 版 (1 9 9 2) に記載の培地番号
1 3 0 4 の培地で 7 5 ° C 、 3 日間培養した。遠心分離に
より集菌し、- 8 0 ° C にて保存した。菌体の収率は
1 . 2 g / リットルであった。

上記のようにして得られた菌体 2 5 g を 5 m M の

E D T A を含む 50 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 5. 5) 50 m l に懸濁し、0℃で15分間、超音波破碎処理により溶菌し、次いで遠心分離を行い上清溶液を得た。

この上清溶液に硫酸を1 M となるように加え、1 M の硫酸、5 m M の E D T A を含む 50 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 5. 5) にて平衡化した疎水クロマトグラフィー (カラム: TOSOH TSK-gel Phenyl-TOYOPEARL 650 S 100 m l) に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次いで300 m l の1 M ~ 0 M 硫酸の線状勾配で標的アミラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜 (分子量カット13000) にて濃縮し、引き続き10 m M トリス塩酸緩衝液 (p H 7. 5) にて洗浄、脱塩した。

次に同緩衝液にて平衡化したイオン交換クロマトグラフィー (カラム: TOSOH TSK-gel DEAE-TOYOPEARL 650 S 100 m l) に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次いで300 m l の0 M ~ 0. 3 M 食塩の線状勾配で標的アミラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜 (分子量カット13000) にて濃縮し、引き続き0. 15 M の食塩、5 m M の E D T A を含む 50 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 5. 5) にて洗浄、脱塩した。

次に脱塩濃縮液をゲル濾過クロマトグラフィー (カラム: Pharmacia HiLoad 16/60 Superdex 200pg) に載せ、同緩衝液にて標的アミラーゼを溶出した。活性画分を限

外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 25 mM ビスートリスーイミノジ酢酸緩衝液（pH 7.1）にて洗浄、脱塩した。

次にこの脱塩濃縮液を同緩衝液にて平衡化したクロマトフォーカシング（カラム：Pharmacia Mono P HR5/20）に載せ、10% Polybuffer 74（Pharmacia 製、イミノジ酢酸にて pH 4.0 に調製したもの）で標的アミラーゼを溶出した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 25 mM ビスートリスーイミノジ酢酸緩衝液（pH 7.1）にて洗浄、脱塩した。

次にこの脱塩濃縮液を、同緩衝液にて平衡化したクロマトフォーカシング（カラム：Pharmacia Mono P HR5/20）に載せ、10% Polybuffer 74（Pharmacia 製、イミノジ酢酸にて pH 4.0 に調製したもの）で標的アミラーゼを溶出した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 0.15 M の食塩、5 mM の EDTA を含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）にて洗浄、脱塩した。

次に脱塩濃縮液をゲル濾過クロマトグラフィー（カラム：TSK-gel G3000SW HPLC）に載せ、同緩衝液にて標的アミラーゼを溶出した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 5 mM の EDTA を含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）

にて洗浄、脱塩した。

最終的にネイティブポリアクリルアミドゲル、S D Sポリアクリルアミドゲル、及び等電点電気泳動にて単一バンドを示す精製酵素を得た。

なお、この精製における活性測定には、基質としてマルトトリオシルトレハロースを用い、その他の方法は実施例 I I - 1 において示した TSK-gel Amide-80 の H P L C 分析法と同様にして行った。

各精製ステップにおける総酵素活性、総蛋白量、比活性を以下の第 1 3 表に示す。

第 1 3 表

精製画分	総酵素活性 (Units)	総蛋白量 (mg)	比活性 (Units/mg)	回収率 (%)	精製度 (倍)
菌体抽出液	3345	1394	2.40	100	1
Phenyl	2112	266	7.9	63	3.3
DEAE	1365	129	10.6	41	4.4
ゲル濾過	651	7.8	83.5	19	35
Mono P	467	0.76	612	14	255
Mono P リクロマト	156	0.12	1301	4.7	542
ゲル濾過リクロマト	98	0.01	13652	2.9	5687

実施例 11-4 S u l f o l o b u sa c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9 株由来の本酵素アミラーゼの精製

S u l f o l o b u s

a c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9 株

を、2 g / リットルの可溶性デンプン及び2 g / リットル

の酵母エキスを含む A m e r i c a n T y p e

C u l t u r e C o l l e c t i o n (A T C C) 発

行 C a t a l o g u e o f B a c t e r i a

a n d P h a g e s 1 8 版 (1 9 9 2) に記載の培

地番号 1 3 0 4 の培地で 7 5 ° C 、 3 日間培養した。遠心

分離により集菌し、- 8 0 ° C にて保存した。菌体の収率

は 2 . 7 g / リットルであった。

上記のようにして得られた菌体 2 5 g を 5 m M の E D

T A を含む 5 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 5 . 5)

5 0 m l に懸濁し、0 ° C で 1 5 分間、超音波破碎処理に

より溶菌し、次いで遠心分離を行い上清溶液を得た。

この上清溶液に硫安を 1 M となるように加え、1 M の

硫安、5 m M の E D T A を含む 5 0 m M 酢酸ナトリウム

緩衝液 (p H 5 . 5) にて平衡化した疎水クロマトグラ

フィー (カラム : T O S O H T S K - g e l P h e n y l - T O Y O P E A R L 6 5 0

S 1 0 0 m l) に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、

次いで 3 0 0 m l の 1 M ~ 0 M 硫安の線状勾配で標的ア

ミラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜 (分子量カ

ット 13000) にて濃縮し、引き続き 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) にて洗浄、脱塩した。

次に同緩衝液にて平衡化したイオン交換クロマトグラフィー (カラム: TOSOH TSK-gel DEAE-TOYOPEARL 650S 100 ml) に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次いで 300 ml の 0 M ~ 0.3 M 食塩の線状勾配で標的アミラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜 (分子量カット 13000) にて濃縮し、引き続き 0.15 M の食塩、5 mM の EDTA を含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) にて洗浄、脱塩した。

次に脱塩濃縮液をゲル濾過クロマトグラフィー (カラム: Pharmacia HiLoad 16/60 Superdex 200pg) に載せ、同緩衝液にて標的アミラーゼを溶出した。活性画分を限外濾過膜 (分子量カット 13000) にて濃縮し、引き続き 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) にて洗浄、脱塩した。

次に脱塩濃縮液に 1 M となるよう硫安を溶解し、同緩衝液にて平衡化した疎水クロマトグラフィー (カラム: TOSOH TSK-gel Phenyl-5PW HPLC) に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次に 30 ml の 1 M ~ 0 M 硫安の線状勾配で標的アミラーゼを溶離した。活性画分を限外濾過膜 (分子量カット 13000) にて濃縮し、引き続き 25 mM ビスートリスイミノジ酢酸緩衝液 (pH 7.1) にて洗浄、脱塩した。

次にこの脱塩濃縮液を、同緩衝液にて平衡化したクロマトフォーカシング（カラム：Pharmacia Mono P HR5/20）に載せ、10% Polybuffer 74（Pharmacia 製、イミノジ酢酸にて pH 4.0 に調製したもの）で標的アミラーゼを溶出した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 5 mM の EDTA を含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）にて洗浄、脱塩した。

最終的にネイティブポリアクリルアミドゲル、SDS ポリアクリルアミドゲル、及び等電点電気泳動にて単一バンドを示す精製酵素を得た。

なお、この精製における活性測定には、基質としてマルトトリオシルトレハロースを用い、その他の方法は実施例 1-1-1 において示した TSK-gel Amide-80 の HPLC 分析法と同様にしてみた。

各精製ステップにおける総酵素活性、総蛋白量、比活性を以下の第 14 表に示す。

第14表

精製画分	総酵素活性 (Units)	総蛋白量 (mg)	比活性 (Units/mg)	回収率 (%)	精製度 (倍)
菌体抽出液	4534	760	5.97	100	1
Phenyl	2428	88.0	27.6	54	4.6
DEAE	927	9.20	101	20	17
ゲル濾過	600	1.10	546	13	92
Phenylリクロマト	392	0.16	2449	9.1	411
Mono P	120	0.04	3195	2.6	558

実施例 11-5 本酵素アミラーゼの諸性質の検討

実施例 11-2 で得られた精製酵素の酵素学的諸性質を測定した。

(1) 分子量

ゲル濃度 6 % の S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分子量測定を行った。マーカートンパク質として分子量 200,000 ; 116,300 ; 97,400 ; 66,300 ; 55,400 ; 36,500 ; 31,000 ; 21,500 ; 14,400 のものを用いた。

その結果、該アミラーゼの分子量は 61,000 であった。

(2) 等電点

アガロースゲル等電点電気泳動の結果、等電点は

4. 8であった。

(3) 安定性

得られた精製酵素の各温度、各pHにおける安定性を、それぞれ図12、図13に示す。酵素活性の測定は、実施例II-1においてマルトトリオシルトレハロースを用いた測定法に準じて行ない、pH3～5の間はグリシン塩酸系緩衝液を、pH4～6の間は酢酸ナトリウム系緩衝液を、pH5～8の間はリン酸ナトリウム系緩衝液を、pH8～9の間はトリス塩酸系緩衝液を、pH9～10の間は炭酸水素ナトリウム系緩衝液を、pH11～13.5の間はKCl-NaOH系緩衝液をそれぞれ用いた。

本酵素は85℃で6時間の処理で安定であり、またpH3.5～10.0の室温6時間の処理で安定であった。

(4) 反応性

得られた精製酵素の各温度、各pHにおける反応性を、それぞれ図14、図15に示す。酵素活性の測定は、実施例II-1においてマルトトリオシルトレハロースを用いた測定法に準じて行ない、pH2～4の間はクエン酸ナトリウム系緩衝液(□)を、pH4～5.5の間は酢酸ナトリウム系緩衝液(○)を、pH5～7.5の間はリン酸ナトリウム系緩衝液(△)を、pH8～9の間はトリス塩酸系緩衝液(◇)をそれぞれ用いた。

本酵素は 70 ~ 85 °C 付近に反応最適温度、pH 4.5 ~ 5.5 付近に反応最適 pH を有する。

(5) 各種活性化剤、阻害剤の影響

実施例 II-1 のマルトトリオシルトレハロース分解活性測定法において以下の第 15 表に示す物質を基質と共に添加し、それぞれの場合の活性測定を実施例 II-1 と同様に行い、活性化又は阻害の有無を調べた。その結果、銅イオン、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) によって阻害を受けることがわかった。但し、SDS による阻害については透析、限外濾過などの方法で SDS を除去することにより、酵素活性が回復した。糖関連酵素ではカルシウムイオンによって活性化される場合が多く認められるが、本酵素ではカルシウムイオンによって活性化されない。

第15表

活性化剤／阻害剤	濃度 (mM)	無添加に対する 相対活性
control (無添加)		100.0
CaCl ₂	5	97.1
MgCl ₂	5	93.5
MnCl ₂	5	101.8
CuSO ₄	5	0
CoCl ₂	5	97.1
FeSO ₄	5	73.5
FeCl ₃	5	38.0
AgNO ₃	5	105.7
EDTA	5	106.3
メルカプトエタノール	5	141.7
ジチオスレイトール	5	116.2
SDS	5	0
グルコース	0.5	109.4
α , α -トレハロース	0.5	98.2
マルトテトラオース	0.5	108.5
マルトペンタオース	0.5	105.8
マルトヘキサオース	0.5	123.8
マルトヘプタオース	0.5	129.2

(6) 基質特異性

本精製酵素 25.0 Units/ml (マルトトリオシルトレハロースを基質として作用させたときの酵素活性) を以下の第16表に示す 10 mM の基質 (アミロペクチン、可溶性デンプンについては 2.8%) に作用させ、分解性及び分解生成物の分析を行った。各種マルトオリゴ糖、アミロース DP-17、アミロペクチン、可溶性デンプン、各種イソマルトオリゴ糖、及びパノースについては単糖 + 2 糖の生成活性を指標として、また、各種トレハロースオリゴ糖、アミロース DP-17 α -1, α -1 転移体 (アミロース DP-17 の還元末端側の、1 つ目と 2 つ目のグルコース残基間の結合が α -1, α -1 であるオリゴ糖) については α , α -トレハロースの生成活性を指標として、マルトース及び α , α -トレハロースについてはグルコースの生成活性を指標として実施例 II-1 に示した TSK-gel Amide-80 HPLC による分析法で分析を行った。

なお、第16表中での酵素活性は、各々単糖及び2糖を1時間に 1 μ mol 遊離する酵素活性を 1 Unit として示した。

結果は以下の第16表及び図16～19に示した通りである。

第16表

基質	生成オリゴ糖	単糖+ 2糖	生成速度
			(Units/ml)
マルトース (G 2)	グルコース		0. 19
マルトトリオース (G 3)	グルコース+G2		0. 30
マルトテトラオース (G 4)	グルコース+G2+G3		0. 31
マルトペンタオース (G 5)	グルコース+G2+G3+G4		1. 79
マルトヘキサオース (G 6)	グルコース+G2+G4+G5		1. 74
マルトヘプタオース (G 7)	グルコース+G2+G5+G6		1. 80
アミロース DP-17	グルコース+G2		2. 35
アミロペクチン	グルコース+G2		0. 33
可溶性デンプン	グルコース+G2		0. 55
α , α -トレハロース	分解せず		0
グルコシルトレハロース	グルコース+トレハロース		0. 04
マルトシルトレハロース	G2+トレハロース		3. 93
マルトトリオシルトレハロース	G3+トレハロース		25. 0
マルトテトラオシルトレハロース	G4+トレハロース		27. 3
マルトペンタオシルトレハロース	G5+トレハロース		25. 5
アミロースDP-17, α -1, α -1転移体	トレハロース		4. 98
イソマルトース	分解せず		0
イソマルトトリオース	分解せず		0
イソマルトテトラオース	分解せず		0
イソマルトペンタオース	分解せず		0
パノース	分解せず		0

註：グルコシルトレハロース、マルトシルトレハロース、マルトテトラオシルトレハロース、マルトペンタオシルトレハロース及びアミロースDP-17、 α -1, α -1転移体は、いずれも実施例II-1におけるマルトトリオシルトレハロースの調製法に準じて製造したものである。

マルトペンタオース、アミロースDP-17、可溶性デンプンからの反応生成物のAMINEX HPX-42A HPLCによる分析結果は、それぞれ図17のA、B、Cに、また、マルトトリオシルトレハロース、マルトペンタオシルトレハロースからの反応生成物のTSK-gel Amide-80 HPLCによる分析結果は、それぞれ図18、図19に示す。

その結果、本精製酵素に関しては、還元末端側のグルコース残基が α -1, α -1結合したマルトトリオシルトレハロース等のトレハロースオリゴ糖に、極めてよく作用し、 α , α -トレハロースと重合度が2つ減少した対応するマルトオリゴ糖を生成することが確認された。またマルトース(G2)～マルトヘプタオース(G7)、アミロース、可溶性デンプンからは、主としてグルコース又はマルトースを遊離することが確認された。しかしながら α -1, α -1結合である α , α -トレハロースに反応せず、また、すべての結合が α -1, 6結合であるイソマルトース、イソマルトトリオース、イソマルトテトラオース及びイソマルトペンタオース、又は、 α -1, 6結合を還元末端から2つ目に有するパノースに対

しても反応しなかった。

(7) エンド型アミラーゼ活性

本精製酵素 200 Units/ml (マルトトリオシルトレハロースを基質として作用させたときの酵素活性) による、可溶性デンプンに作用させた時のヨウ素発色の消失、及び単糖及び2糖の生成量から求めたデンプン加水分解率の経時変化を、実施例 11-1 に示したデンプン分解活性測定法、及び AMINEX HPX-42A HPLC による分析法により分析を行った。

その結果、図 20 に示した様に、本精製酵素に関してはヨウ素反応呈色度が 50% 消失した時点での加水分解率は 3.7% と低く、従ってエンド型アミラーゼの性質を示すことが確認された。

(8) 作用機作の検討

ウリジンジホスホグルコース [グルコース-6 - ^3H]、及びマルトテトラオースにグリコーゲンシンターゼ (ウサギ骨格筋由来、Sigma 社製 G-2259) を作用させ、非還元末端のグルコース残基を ^3H で放射能ラベル化したマルトペンタオースを合成させ、分取精製した。次にこの放射能ラベル化した 10 mM のマルトペンタオースを基質とし、*Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の精製トランスフェラーゼ 10 Units/ml (マルトトリオースを基質として作用させたときの酵素活性) を添加し、60℃、

3 hr 作用させ、非還元末端のグルコース残基を ^3H で放射能ラベル化したマルトリオシルトレハロースを合成させ、分取精製した。（なお、この生成物にグルコアミラーゼ（*Rhizopus* 由来、生化学工業製）を作用させ、グルコースと α , α -トレハロースに完全に分解させた。これらを薄層クロマトグラフィーにて分取し、それぞれ液体シンチレーションカウンターで放射能を測定したところ、 α , α -トレハロース画分に放射活性は見られず、グルコース画分に放射活性が認められ、よって、非還元末端のグルコース残基が放射能ラベル化されていることを確認した。）

以上のように調製した非還元末端のグルコース残基を ^3H で放射能ラベル化したマルトペンタオース、及び非還元末端のグルコース残基を ^3H で放射能ラベル化したマルトリオシルトレハロースを基質として、これらに実施例 II-2 で得られた精製酵素をそれぞれ 50 Units/ml 及び 5 Units/ml 作用させ、反応前、及び 60 °C、0.5、1 及び 3 時間後にサンプリングを行った。この反応物を薄層クロマトグラフィー（Kieselgel 60 メルク社製、溶媒：ブタノール-エタノール-水 = 5 : 5 : 3）で展開した。得られた各糖に相当するところを分取し、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。その結果をそれぞれ図 21、及び図 22 に示す。

図 21、22 より明らかなように、マルトペンタオー

スを基質とした場合、加水分解産物であるグルコース、マルトース画分には放射活性は見られず、マルトテトラオース、マルトトリオース画分に放射活性が認められた。またマルトトリオシルトレハロースを基質とした場合、加水分解産物である α 、 α -トレハロース画分には放射活性は見られず、マルトトリオース画分に放射活性が認められた。

よって、本精製酵素の作用機作はエンド型に作用するアミラーゼ活性と共に、還元末端側から主に単糖、2糖を生成する活性を有するものであることがわかった。

なお、実施例11-3、4で得た *Sulfolobus solfatarius* DSM 5833 株、及び *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 株由来の各精製酵素についても同様の方法により酵素学的諸性質を調べ、その結果を前記した第2表に示した。

比較例11-1 豚臓 α -アミラーゼによる各種オリゴ糖の分解性と分解生成物の分析

ブタ豚臓由来 α -アミラーゼは、マルトオリゴ糖を還元末端から2糖または3糖単位で加水分解することが知られている（澱粉・関連糖質酵素実験法 P135、中村道徳、貝沼圭二、学会出版センター）。そこで、本発明の新規アミラーゼの比較例としてブタ豚臓由来 α -アミラーゼ（Sigma社製、A-6255）1 Units/ml（デンプンを基

質として、pH 6.9、20℃において3分間に1mgのマルトースに相当する還元糖を生成する酵素量を1 Unitとする)を以下の第17表に示す10mMの基質にpH 6.9、20℃にて作用させ、分解性及び分解生成物の分析を行った。酵素活性は2糖+3糖の生成活性を指標として、実施例II-1に示したTSK-gel Amide-80 HPLC分析法で分析を行った。

なお、第17表中での酵素活性は、各オリゴ糖を1時間に1 μ mol遊離する酵素活性を1 Unitとして示した。

結果は以下の第17表及び図23、24に示した通りである。

第17表

基質	生成オリゴ糖	2糖+3糖 生成速度 (Units/ml)
マルトトリオース (G3)	分解せず	0
マルトテトラオース (G4)	グルコース+G2+G3	0.49
マルトペンタオース (G5)	G2+G3	6.12
マルトヘキサオース (G6)	G2+G3+G4	4.44
マルトヘプタオース (G7)	G2+G3+G4+G5	4.45
グルコシルトレハロース	分解せず	0
マルトシルトレハロース	分解せず	0
マルトトリオシルトレハロース	G2+ グルコシルトレハロース	0.03
マルトテトラオシルトレハロース	G3+ グルコシルトレハロース	2.57
マルトペンタオシルトレハロース	G3+ マルトシルトレハロース	4.36

註：グルコシルトレハロース、マルトシルトレハロース、マルトテトラオシルトレハロース及びマルトペンタオシルトレハロースは、いずれも実施例II-1におけるマルトトリオシルトレハロースの調製法に準じて製造したものである。

マルトペンタオシルトレハロースからの反応生成物の TSK-gel Amide-80 HPLC による分析結果を図24に示す。

その結果、膵臓アミラーゼはマルトテトラオース (G4) ~ マルトヘプタオース (G7) からマルトースあるいはマルトトリオースと重合度が2つまたは3つ減少した対応するマルトオリゴ糖を生成するが、還元末端側のグルコース残基が $\alpha-1$, $\alpha-1$ 結合したグルコシルトレハロース、マルトオリゴシルトレハロース等のトレハロースオリゴ糖からは α , α -トレハロースを遊離しない上、反応性が低いことが確認された。

実施例II-6 可溶性デンプン、及び各種デンプン分解物からの α , α -トレハロースの製造

実施例II-2で得られた本精製酵素 150 Units/ml、及び *Sulfolobus solfataricus* KM1株由来の精製トランスフェラーゼ 10 Units/mlを用い、基質を、可溶性デンプン（ナカライテスク社製、特級品）；デンプン分解物として、*Klebsiella pneumoniae* 由来のプルラーゼ（和光純薬製） 25 Units/mlで 40℃、1 hr の条件の下で予め $\alpha-1$, 6

結合を分解しておいた可溶性デンプン；また別のデンプン分解物として、*Bacillus amyloliquefaciens*由来の α -アミラーゼ（ベーリンガー・マンハイム社製）12.5 Units/mlで30℃、2.5 hrの条件の下で予め部分分解しておいた可溶性デンプン；パインデックス#1；パインデックス#3（ともに松谷化学製）；G3～G7マルトオリゴ糖各単独；及びアミロースDP-17（いずれも林原バイオケミカル製）として、それぞれ最終濃度10%、60℃、pH5.5の条件下で約100 hr反応させ、用いた酵素の相乗作用を利用した α ， α -トレハロースの製造を試みた。

反応液は基質を可溶性デンプンとした場合を例として、実施例II-1に示したAMINEX HPX42A HPLC 分析法による分析を行った。

また、未反応の基質をグルコアミラーゼにて分解後、実施例II-1に示したTSK-gel Amide-80 HPLC 分析法による分析を行い、生成した α ， α -トレハロースの収率を調べた。

なお、本発明の新規アミラーゼの活性は、実施例II-1と同様に、マルトトリオシルトレハロースから1時間に1 μ molの α ， α -トレハロースを遊離する酵素活性を1 Unitとして示した。

Sulfolobus solfataricus
KM1株由来の精製トランスフェラーゼの活性は、マル

トトリオースを基質として pH 5.5、60℃で1時間に1 μ molのグルコシルトレハロースを生成する酵素活性を1 Unitとして示した。

プルラナーゼの活性は、プルランを基質として pH 6.0、30℃で1分間に1 μ molのマルトトリオースを生成する酵素活性を1 Unitとして示した。

その結果は以下の第18表に示した。

第18表

基質	α , α - トレハロース 収率 (%)
可溶性デンプン	37.0
プルラナーゼ処理デンプン	62.1
アミラーゼ処理デンプン	42.2
パインデックス#1	49.9
パインデックス#3	40.4
マルトトリオース (G3)	36.4
マルトテトラオース (G4)	47.8
マルトペンタオース (G5)	60.0
マルトヘキサオース (G6)	61.8
マルトヘプタオース (G7)	67.1
アミロース DP-17	83.5

可溶性デンプンからの反応生成物の AMINEX HPX42A HPLC による分析結果は図 25 に示す。

その結果、可溶性デンプンを基質とした場合、37.0%の収率にて α , α -トレハロースを生成した。また各種デンプン分解物ではプルラーゼにて α -1, 6結合を加水分解した可溶性デンプンを基質とした場合、62.1%、全ての結合が α -1, 4結合である各種マルトオリゴ糖、及びアミロース DP-17ではそれぞれ36.4~67.1%、及び83.5%であった。これらの結果は、 α -1, 4結合の直鎖が長い基質を用いるほど最終製品の α , α -トレハロースの収率が高いことを示している。

実施例 11-7 可溶性デンプンからの各種酵素濃度における α , α -トレハロースの製造

実施例 11-2 で得られた本精製酵素、及び *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の精製トランスフェラーゼを用い、基質を、*Klebsiella pneumoniae* 由来のプルラーゼ（和光純薬製）25 Units/ml で 40℃、1 hr の条件下で前処理した可溶性デンプンとし、該基質（最終濃度 10%）に第 19 表に示した濃度の酵素をそれぞれ添加して 60℃、pH 5.5 にて約 100 hr 反応させて、これら酵素の相乗作用を利用した α , α -トレハロースの製造を試みた。反応液は未反応の基質をグルコアミラーゼにて分解

後、実施例 11-1 に示した TSK-gel Amide-80 HPLC 分析法により分析を行い、生成した α , α -トレハロースの収率を調べた。

なお、本発明の新規アミラーゼの活性は、実施例 11-1 と同様に、マルトトリオシルトレハロースから 1 時間に $1 \mu\text{mol}$ の α , α -トレハロースを遊離する酵素活性を 1 Unit として示した。

Sulfolobus solfataricus
KM1 株由来の精製トランスフェラーゼの活性は、マルトトリオースを基質として pH 5.5、60℃ で 1 時間に $1 \mu\text{mol}$ のグルコシルトレハロースを生成する酵素活性を 1 Unit として示した。

プルラナーゼの活性は、プルランを基質として pH 6.0、30℃ で 1 分間に $1 \mu\text{mol}$ のマルトトリオースを生成する酵素活性を 1 Unit として示した。

その結果は以下の第 19 表に示した。

第19表

 α , α -トレハロース収率 (%)

アミラーゼ 濃度 (Units/ml)	トランスフェラーゼ濃度 (Units/ml)				
	0.1	1	5	10	20
1.5	7.8	28.0	9.6	8.8	9.7
15	10.0	45.3	34.3	33.6	35.2
150	8.6	51.8	59.3	62.1	65.1
450	1.6	45.1	58.9	61.7	64.2
700	1.3	19.0	39.3	44.5	46.8
2000	1.7	12.9	31.5	40.3	42.7

表の結果より、 α , α -トレハロースの収率は、トランスフェラーゼ 20 Units/ml、アミラーゼ 150 Units/ml のとき最大となり、65.1% に達したことがわかる。

比較例 11-2 他の生物起源のアミラーゼを用いた α , α -トレハロースの製造

本発明の新規アミラーゼの比較として、*Bacillus subtilis*、*Bacillus licheniformis* 及び *Aspergillus oryzae* 由来のアミラーゼ（それぞれ、生化学工業製 100200、Sigma 製 A-3403、及び A-0273：いずれも 60℃ にて活性を有する。）を用い、*Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の精製トランスフェラーゼとの併用におい

て、基質を *Klebsiella pneumoniae* 由来のプルラーゼ（和光純薬製）25 Units/ml で 40 °C、1 hr の条件下で前処理した可溶性デンプン（最終濃度 10 %）として、該基質に、第 20 表に示した濃度の酵素をそれぞれ添加し、60 °C、pH 5.5 にて約 100 hr 反応させ、これら酵素の相乗作用を利用した α , α -トレハロースの製造を試みた。反応液は未反応の基質をグルコアミラーゼにて分解後、実施例 II-1 に示した TSK-gel Amide-80 HPLC 分析法により分析を行い、生成した α , α -トレハロースの収率を調べた。

なお、アミラーゼの酵素活性は、実施例 II-1 と同様の条件にて反応させて、デンプン-ヨウ素複合体の青紫色による 620 nm の吸光を 10 分間に 10 % 減少させる酵素量を 1 Unit として示した。

Sulfolobus solfataricus
KM 1 株由来の精製トランスフェラーゼの活性は、マルトトリオースを基質として pH 5.5、60 °C で 1 時間に 1 μ mol のグルコシルトレハロースを生成する酵素活性を 1 Unit として示した。

プルラーゼの活性は、プルランを基質として pH 6.0、30 °C で 1 分間に 1 μ mol のマルトトリオースを生成する酵素活性を 1 Unit として示した。

その結果は以下の第 20 表に示した。

第 20 表

トランスフェ ラーゼ濃度 (Units/ml)	α - アミラーゼ 起源	α - アミラーゼ濃度 (Units/ml)	α , α - トレ ハロース収率 (%)
10	<i>Bacillus subtilis</i>	1.0	28.9
10		10.0	27.7
5	<i>Bacillus licheniformis</i>	10.0	26.4
10		10.0	26.8
5	<i>Aspergillus oryzae</i>	1.0	23.2
10		1.0	23.1

表の結果より、他の生物起源のアミラーゼを用いても、 α , α -トレハロースを生成することはできるが、いずれも収率は、本発明の新規酵素を用いた場合よりも低いことがわかった。

実施例 II-8 アミロース DP-17 からの各種酵素濃度における α , α -トレハロースの製造

実施例 II-2 で得られた本精製酵素、及び
Sulfolobus solfataricus
 KM1 株由来の精製トランスフェラーゼを用い、基質を、
 アミロース DP-17 (林原バイオケミカル製) (最終濃度 10%) として、該基質に、第 21 表に示した濃度の酵素をそれぞれ添加し、60℃、pH 5.5 にて約 100 hr 反応させ、これら酵素の相乗作用を利用した

α , α -トレハロースの製造を試みた。反応液は未反応の基質をグルコアミラーゼにて分解後、実施例II-1に示したTSK-gel Amide-80 HPLC分析法により分析を行い、生成した α , α -トレハロースの収率を調べた。

なお、本発明の新規アミラーゼ活性は、実施例II-1と同様に、マルトリオシルトレハロースから1時間に1 μ molの α , α -トレハロースを遊離する酵素活性を1 Unitとして示した。

Sulfolobus solfataricus KM1株由来の精製トランスフェラーゼの活性は、マルトリオースを基質としてpH 5.5、60℃で1時間に1 μ molのグルコシルトレハロースを生成する酵素活性を1 Unitとして示した。

その結果は以下の第21表に示した。

第21表

α , α -トレハロース収率 (%)

アミラーゼ 濃度 (Units/ml)	トランスフェラーゼ濃度 (Units/ml)				
	0.1	1	5	10	20
1.5	11.9	46.8	52.1	48.4	40.4
15	25.6	77.9	79.7	81.8	77.4
150	10.7	62.1	76.9	83.4	81.9
200	2.8	47.9	73.2	76.1	79.2
700	1.2	17.0	49.1	61.8	68.4
2000	0.6	9.2	27.5	36.7	48.7

表の結果より、直鎖状の α -1, 4 結合からなるアミロース DP-17 を基質とした場合には α , α -トレハロースの収率は、トランスフェラーゼ 10 Units/ml、アミラーゼ 150 Units/ml のとき最大となり、83.4% に達したことがわかる。

実施例 II-9 各種可溶性デンプン濃度における α , α -トレハロースの製造

実施例 II-2 で得られた本精製酵素、及び *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の精製トランスフェラーゼを用い、基質を可溶性デンプンとし、該基質の最終濃度 5%、10%、20%、及び 30% のものに、第 22 表に示した濃度の酵素をそれぞれ添加し、60℃、pH 5.5 にて約 100 hr 反応させ、これらの酵素の相乗作用を利用した α , α -トレハロースの製造を試みた。この際、反応途中、0 hr から 96 hr の間、0 hr も含めて 12 hr 毎に合計 9 回、5 Units/ml となるようプルラナーゼ (*Klebsiella pneumoniae* 由来品、和光純薬製) を添加し、40℃、1 hr の条件下で処理した。

反応液は未反応の基質をグルコアミラーゼにて分解後、実施例 II-1 に示した TSK-gel Amide-80 HPLC 分析法により分析を行い、生成した α , α -トレハロースの収率を調べた。

なお、本発明の新規アミラーゼの活性は、実施例 11-1 と同様に、マルトリオシルトレハロースから 1 時間に $1 \mu\text{mol}$ の α , α -トレハロースを遊離する酵素活性を 1 Unit として示した。

Sulfolobus solfataricus KM1 株由来の精製トランスフェラーゼの活性は、マルトリオースを基質として pH 5.5、60℃で 1 時間に $1 \mu\text{mol}$ のグルコシルトレハロースを生成する酵素活性を 1 Unit として示した。

プルナーゼの活性は、プルランを基質として pH 6.0、30℃で 1 分間に $1 \mu\text{mol}$ のマルトリオースを生成する酵素活性を 1 Unit として示した。

その結果は以下の第 22 表に示した。

第 22 表

可溶性デンプン 濃度 (%)	トランスフェ ラーゼ濃度 (Units/ml)	アミラーゼ 濃度 (Units/ml)	α , α -トレ ハロース収率 (%)
5	2	50	76.6
	5	150	74.4
10	10	150	77.4
	20	150	78.2
20	10	150	75.7
	20	150	75.0
30	10	150	71.4
	20	150	71.9

表の結果より、基質の可溶性デンプンの濃度を5～30%と変化させた場合でも、アミラーゼ及びトランスフェラーゼ濃度を最適条件の下で使用するにより、 α , α -トレハロースの収率を、いずれも70%以上とすることができることがわかる。

実施例 11-10 各種プルラナーゼ処理を含む可溶性デンプンからの α , α -トレハロースの製造

実施例 11-2 で得られた本精製酵素、及び
S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
K M 1 株由来の精製トランスフェラーゼを用い、基質を、可溶性デンプン（最終濃度10%）として、該基質に第23表に示した濃度の酵素をそれぞれ添加し、60℃、pH 5.5にて約120hr反応させ、これら酵素の相乗作用を利用した α , α -トレハロースの製造を試みた。この際、反応途中24hr後に1回（a）、48hr後に1回（b）、72hr後に1回（c）、96hr後に1回（d）、24hrから96hrの間、24hr毎に合計4回（e）、0hrから96hrの間、0hrも含めて12hr毎に合計9回（f）、及び0hrから12hrの反応初期段階に、0hrも含めて3hr毎に合計5回、その後は24hrから96hrの間、12hr毎に合計7回（g）の条件の下で表中に示した濃度となるようにプルラナーゼ（*Klebsiella pneumoniae* 由来品）を添加し、いずれの場合にも添加後40℃、1hrの条

件の下でプルラナーゼ処理をした。

反応液は未反応の基質をグルコアミラーゼにて分解後、実施例II-1に示したTSK-gel Amide-80 HPLC分析法により分析を行い、生成した α , α -トレハロースの収率を調べた。

なお、本発明の新規アミラーゼの活性は、実施例II-1と同様に、マルトトリオシルトレハロースから1時間に1 μ molの α , α -トレハロースを遊離する酵素活性を1 Unitとして示した。

Sulfolobus solfataricus
KM1株由来の精製トランスフェラーゼの活性は、マルトトリオースを基質としてpH 5.5、60℃で1時間に1 μ molのグルコシルトレハロースを生成する酵素活性を1 Unitとして示した。

プルラナーゼの活性は、プルランを基質としてpH 6.0、30℃で1分間に1 μ molのマルトトリオースを生成する酵素活性を1 Unitとして示した。

その結果は以下の第23表に示した。

第23表

α , α -トレハロース収率 (%)								
プルラ ナーゼ 処理方法	アミラーゼ 濃度 (Units/ml)	トランス フェラーゼ 濃度 (Units/ml)	プルラナーゼ濃度 (Units/ml)					
			0.1	1	2	5	10	25
(a)	150	10	48.0	59.7	62.9	67.6		71.7
(b)	150	10	49.4	60.0	62.2	66.0		71.0
(c)	150	10	49.6	59.7	63.2	66.4		70.0
(d)	150	10	49.2	59.3	62.9	67.0		70.0
(e)	150	10	57.8	69.9	72.6	74.1		
(f)	150	10		74.0	76.6	77.4		67.6
	150	20		74.4	74.0	78.2		67.0
(g)	150	10		75.7	76.5	80.9	61.9	
	150	20		75.9	77.9	77.0	71.5	

表の結果より、反応途中にプルラナーゼ処理を導入することにより収率を向上させることができ、しかも、複数回にわたって該処理をする方法、或いは反応初期段階で複数回にわたって該処理をする方法において、 α , α -トレハロースの収率を一段と向上させることができることがわかった。トランスフェラーゼ 10 Units/ml、アミラーゼ 150 Units/ml、プルラナーゼ処理方法 (g)、プルラナーゼ 5 Units/ml の条件下で α , α -トレハロースの収率は最大となり、80.9%に達した。

実施例 II-11 各種アミロース DP-17 濃度及び
各種反応温度における α , α -トレハロースの製造

実施例 II-2 で得られた本精製酵素、及び
Sulfolobus solfataricus
KM1 株由来の精製トランスフェラーゼを、それぞれ
320 Units / g - 基質、及び 20 Units / g - 基質と
なるように添加し、基質をアミロース DP-17 として、
第 24 及び 25 表に示した基質濃度及び反応温度におい
て、それぞれ約 100 hr 反応させ、これら酵素の相乗
作用を利用した α , α -トレハロースの製造を試みた。

反応液は未反応の基質をグルコアミラーゼにて分解後、
実施例 II-1 に示した TSK-gel Amide-80 HPLC 分析法に
より分析を行い、生成した α , α -トレハロースの収率
及び反応速度を調べた。

なお、本発明の新規アミラーゼの活性は、実施例 II-
1 と同様に、マルトトリオシルトレハロースから 1 時間
に 1 μ mol の α , α -トレハロースを遊離する酵素活
性を 1 Unit として示した。

Sulfolobus solfataricus
KM1 株由来の精製トランスフェラーゼの活性は、マル
トトリオースを基質として pH 5.5、60℃で 1 時間
に 1 μ mol のグルコシルトレハロースを生成する酵素
活性を 1 Unit として示した。

その結果は以下の第 24 及び 25 表に示した。

なお、第24表中の反応速度は、1時間に1 μmol の α , α -トレハロースを遊離する速度を1 Unitとして示した。

第24表

反応温度 (°C)	反応速度 (Units /ml)			
	基質濃度 (%)			
	10	20	30	40
40	1.1	1.8	4.8	6.2
50	3.2	8.1	7.7	12.3
60	6.8	16.2	23.8	23.1
70	12.0	29.3	32.3	55.6
80	13.3	30.8	66.9	88.0

第25表

反応温度 (°C)	反応収率 (%)			
	基質濃度 (%)			
	10	20	30	40
40	42.7	50.3	42.6	28.8
50	71.0	70.2	64.6	35.2
60	74.6	72.5	66.2	65.8
70	75.1	75.0	65.4	70.7
80	69.3	68.2	68.4	70.9

表の結果より、反応温度を40～80℃に上げると温

度依存的に反応速度は増加することがわかった。また、低温（40～50℃）では基質濃度を高濃度（30～40％）とすると不溶化し、収率が著しく低下するが、高温にすると基質が溶解し、収率も高く維持できた。収率は75.1％に達した。

本実施例の結果から、耐熱性の高い本発明のアミラーゼを用いることにより、高温、高濃度仕込を可能とし、経済的にも、ハンドリングの容易さの観点からも有利な α ， α -トレハロースの製造法を提供し得ることが理解される。

実施例 11-12 各種可溶性デンプン濃度及び各種反応温度における、耐熱性プルラナーゼを用いた α ， α -トレハロースの製造

実施例 11-2 で得られた本精製酵素、
S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
K M 1 株由来の精製トランスフェラーゼ、及び市販耐熱性プルラナーゼ（デブランチングエンザイム アマノ
（Bacillus sp. 由来品、天野製薬社製）；なお、疎水クロマトグラフィー TOSOH TSK-gel Phenyl-TOYOPEARL 650Sにより、混在するグルコアミラーゼ活性及び α -アミラーゼ活性を除去した）を、それぞれ1280 Units / g - 基質、80 Units / g - 基質、及び32 Units / mlとなるように添加し、基質を可溶性デンプンとして、第26及び27表に示した基質濃度及び反応温度におい

て、それぞれ約 100 hr 反応させ、これら酵素の相乗作用を利用した α , α -トレハロースの製造を試みた。

反応液は未反応の基質をグルコアミラーゼにて分解後、実施例 II-1 に示した TSK-gel Amide-80 HPLC 分析法により分析を行い、生成した α , α -トレハロースの収率及び反応速度を調べた。

なお、本発明の新規アミラーゼの活性は、実施例 II-1 と同様に、マルトトリオシルトレハロースから 1 時間に 1 μ mol の α , α -トレハロースを遊離する酵素活性を 1 Unit として示した。

Sulfolobus solfataricus KM1 株由来の精製トランスフェラーゼの活性は、マルトトリオースを基質として pH 5.5、60℃で 1 時間に 1 μ mol のグルコシルトレハロースを生成する酵素活性を 1 Unit として示した。

プルナーゼの活性はプルランを基質として pH 5.5、60℃で 1 分間に 1 μ mol のマルトトリオースを生成する酵素活性を 1 Unit として示した。

その結果は以下の第 26 及び 27 表に示した。

なお、第 26 表中の反応速度は、1 時間に 1 μ mol の α , α -トレハロースを遊離する速度を 1 Unit として示した。

第26表

反応速度 (Units /ml)			
反応温度 (°C)	基質濃度 (%)		
	10	20	30
40	15.8	22.8	22.2
50	26.0	50.8	57.5
60	36.5	58.4	96.4

第27表

反応収率 (%)			
反応温度 (°C)	基質濃度 (%)		
	10	20	30
40	53.1	8.9	6.2
50	70.9	56.1	58.6
60	74.1	72.6	71.7

なお、耐熱性プルラナーゼを添加しない以外は基質濃度10%、反応温度60℃において、上記の条件下で反応させたところ、反応収率は35.0%であった。

表の結果より、耐熱性プルラナーゼは反応にあたり一度添加するのみで収率向上効果が得られ、反応温度を40～60℃に上げると温度依存的に反応速度は増加することがわかった。また、低温(40～50℃)では基質濃度を高濃度(20～30%)とすると不溶化し、収率が著しく低下するが、高温(60℃)にすると基質が

溶解し、収率も高く維持できた。収率は、74.1%に達した。

実施例 11-13 イソアミラーゼ処理を含む可溶性デンプンからの α , α -トレハロースの製造

実施例 11-2 で得られた本精製酵素、及び
S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
K M 1 株由来の精製トランスフェラーゼを用い、基質を可溶性デンプン（最終濃度 10%）として、該基質にそれぞれ 1280 Units / g - 基質、及び 80 Units / g - 基質となるように添加し、60℃、pH 5.0 にて約 100 hr 反応させ、これら酵素の相乗作用を利用した α , α -トレハロースの製造を試みた。この際、0 hr から 12 hr の反応初期段階に、0 hr も含めて 3 hr 毎に合計 5 回、その後は 24 hr から 96 hr の間、24 hr 毎に合計 3 回の条件の下でイソアミラーゼ（*Pseudomonas amyloclavata* 由来品、生化学工業）を第 28 表に示した濃度となるように添加し、いずれの場合にも添加後 40℃、1 hr の条件の下でイソアミラーゼ処理をした。

反応液は未反応の基質をグルコアミラーゼにて分解後、実施例 11-1 に示した TSK-gel Amide-80 HPLC 分析法により分析を行い、生成した α , α -トレハロースの収率を調べた。

なお、本発明の新規アミラーゼの活性は、実施例 11-

1と同様に、マルトトリオシルトレハロースから1時間に1 μmol の α , α -トレハロースを遊離する酵素活性を1 Unitとして示した。

Sulfolobus solfataricus KM1株由来の精製トランスフェラーゼの活性は、マルトトリオースを基質としてpH 5.5、60℃で1時間に1 μmol のグルコシルトレハロースを生成する酵素活性を1 Unitとして示した。

イソアミラーゼの活性は、1%可溶性モチゴメデンプン0.5 mlに0.5 M酢酸緩衝液pH 3.5を0.1 ml、酵素液0.1 mlを混合して40℃で反応させ、アミロース-ヨウ素複合体の青紫色による610 nmの吸光度を1 cm幅のセルで測定し（澱粉、関連糖質酵素実験法、中村道徳、貝沼圭二、学会出版センター刊、1989年）、1時間に0.1増加させる酵素量を1 Unitと定義した。

その結果は以下の第28表に示した。

第28表

イソアミラーゼ濃度 (Units /ml)	反応収率 (%)
0	35.0
500	75.7
1000	73.7
2000	71.0

表の結果より、プルラナーゼ (*Klebsiella pneumoniae* 由来品) の場合と同様に、反応途中にイソアミラーゼ処理を導入することにより収率を向上させることができ、 α , α -トレハロースの収率は、75.7%に達した。

実施例 11-14 *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来枝切り酵素処理を含む可溶性デンプンからの α , α -トレハロースの製造

実施例 11-2 で得られた本精製酵素、
Sulfolobus solfataricus
KM1 株由来の精製トランスフェラーゼ、及び
Sulfolobus solfataricus
KM1 株の枝切り酵素 (参考例 11-3 の方法に準じて菌体抽出液より分離精製したもの) を、それぞれ 1280 Units / g - 基質、80 Units / g - 基質、及び下表中に示す濃度となるように添加し、基質を可溶性デンプン (最終濃度 10%) として、60℃、pH 5.5 として、約 100 hr 反応させ、これら酵素の相乗作用を利用した α , α -トレハロースの製造を試みた。

反応液は未反応の基質をグルコアミラーゼにて分解後、実施例 11-1 に示した TSK-gel Amide-80 HPLC 分析法により分析を行い、生成した α , α -トレハロースの収率を調べた。

なお、本発明の新規アミラーゼの活性は、実施例11-1と同様に、マルトリオシルトレハロースから1時間に1 μmol の α , α -トレハロースを遊離する酵素活性を1 Unitとして示した。

Sulfolobus solfataricus
KM1株由来の精製トランスフェラーゼの活性は、マルトリオースを基質としてpH 5.5、60℃で1時間に1 μmol のグルコシルトレハロースを生成する酵素活性を1 Unitとして示した。

Sulfolobus solfataricus
KM1株由来の精製枝切り酵素の活性は、1%可溶性モチゴメデンプン0.5 mlに0.5 M酢酸緩衝液pH 5.0を0.1 ml、酵素液0.1 mlを混合して60℃で反応させ、アミロース-ヨウ素複合体の青紫色による610 nmの吸光度を1 cm幅のセルで測定し、1時間に0.1増加させる酵素量を1 Unitと定義した。

その結果は以下の第29表に示した。

第29表

枝切り酵素濃度 (Units /ml)	反応収率 (%)
0	35.0
3	69.8
6	69.5
12	68.0
24	67.8

表の結果より、耐熱性プルラナーゼ（デブランチング
エンザイム アマノ、*Bacillus* sp. 由来品）の場合と
同様に、*Sulfolobus*
solfataricus KM1株由来の枝切り酵素
は反応にあたり一度添加するのみで収率を向上させるこ
とができ、 α 、 α -トレハロースの収率は、69.8%
に達した。

参考例II-1 各種アミロース DP-17濃度及び各
種反応温度におけるトランスフェラーゼによる転移オリ
ゴ糖の製造

Sulfolobus solfataricus
KM1株由来の精製トランスフェラーゼを、20 Units
/g-基質となるように添加し、基質をアミロースDP

- 17 として、第 30 及び 31 表に示した基質濃度及び反応温度において、それぞれ約 100 hr 反応させ、還元末端側のグルコース残基が $\alpha-1$, $\alpha-1$ 結合した対応のトレハロースオリゴ糖を生成させた。

生成した還元末端側のグルコース残基が $\alpha-1$, $\alpha-1$ 結合した対応のトレハロースオリゴ糖は、ジニトロサリチル酸法（澱粉・関連糖質酵素実験法、中村道徳・貝沼圭二、学会出版センター刊、1989年）によりその還元末端量を測定し、その減少量より収率及び反応速度を調べた。

Sulfolobus solfataricus
KM1 株由来の精製トランスフェラーゼの活性は、マルトトリオースを基質として pH 5.5、60℃で1時間に 1 μmol のグルコシルトレハロースを生成する酵素活性を 1 Unit として示した。

その結果は以下の第 30 及び 31 表に示した。

なお、第 30 表中の反応速度は、1 時間に 1 μmol の α , α -トレハロースを遊離する速度を 1 Unit として示した。

第30表

反応温度 (°C)	反応速度 (Units /ml)			
	基質濃度 (%)			
	10	20	30	40
40	0.8	2.9	3.5	4.3
50	3.0	5.5	8.6	8.1
60	1.7	6.5	10.3	16.7
70	4.0	7.0	12.0	19.8
80	3.6	9.4	15.8	20.4

第31表

反応温度 (°C)	反応収率 (%)			
	基質濃度 (%)			
	10	20	30	40
40	70.7	74.5	63.4	37.6
50	76.0	72.8	70.5	46.7
60	71.6	75.1	75.3	55.1
70	71.6	70.4	76.6	72.6
80	65.6	64.8	72.7	72.5

表の結果より、反応温度を40～80℃に上げると温度依存的に反応速度は増加することがわかった。また、低温（40～50℃）では基質濃度を高濃度（特に40

%) とすると不溶化し、収率が著しく低下するが、高温にすると基質が溶解し、収率も高く維持できた。モル収率は 76.6% に達した。

参考例 11-2 アミロース DP-17 の水に対する溶解度の測定

アミロース DP-17 を 5、10、20、30、40% (w/vol) 溶液となるように加熱溶解した後、35、40、50、60、70、80℃ の高温槽に入れ、経時的にサンプリングし、生じた不溶物を濾過して得られた上清溶液中のアミロース DP-17 濃度を求め、平衡となった濃度を飽和点として溶解度を求めた。

その結果は以下の第 32 表に示した。

第 32 表

温度 (°C)	溶解度 (% (w/vol))
35	11.3
40	13.0
50	18.9
60	27.6
70	32.3
80	35.3

参考例 11-3 S u l f o l o b u s

s o l f a t a r i c u s K M 1 株由来枝切り酵素の
精製

S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
K M 1 株を、2 g / リットルの可溶性デンプン及び 2 g
/ リットルの酵母エキスを含む
A m e r i c a n T y p e C u l t u r e
C o l l e c t i o n (A T C C) 発行
C a t a l o g u e o f B a c t e r i a a n d
P h a g e s 1 8 版 (1 9 9 2) に記載の培地番号
1 3 0 4 の培地で 7 5 ° C 、 3 日間培養した。遠心分離に
より集菌し、- 8 0 ° C にて保存した。菌体の収率は
3 . 3 g / リットルであった。

上記のようにして得られた菌体 8 2 g を 5 m M の E D
T A を含む 5 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 5 . 5)
4 0 0 m l に懸濁させ、0 ° C で 1 5 分間、超音波破碎処
理により溶菌し、次いで遠心分離を行い上清溶液を得た。

この上清溶液に硫安を 1 M となるように加え、1 M の
硫安、5 m M の E D T A を含む 5 0 m M 酢酸ナトリウム
緩衝液 (p H 5 . 5) にて平衡化した疎水クロマトグラ
フィー (カラム : T O S O H T S K - g e l P h e n y l - T O Y O P E A R L
6 5 0 S 8 0 0 m l) に通した。カラムを同緩衝液にて洗
浄し、素通り画分中に標的枝切り酵素を回収した。上清
溶液中に含まれているアミラーゼ、トランスフェラーゼ、

及びグルコアミラーゼはカラム充填剤 Phenyl-TOYOPEARL 650S に保持、吸着されるので、標的枝切り酵素とは分離された。活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 10 mM トリス塩酸緩衝液（pH 7.5）にて洗浄し、脱塩した。

次いで同緩衝液にて平衡化したイオン交換クロマトグラフィー（カラム：TOSOH TSK-gel DATE-TOYOPEARL 650S 300 ml）に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、引き続き 900 ml の 0 M ~ 0.3 M 食塩の線状勾配で標的枝切り酵素を溶出した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、次いで 0.15 M の食塩、5 mM の EDTA を含む 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）にて洗浄し、脱塩した。

この脱塩濃縮液をゲル濾過クロマトグラフィー（カラム：Pharmacia HiLoad 16/60 Superdex 200pg）に載せ、同緩衝液にて標的枝切り酵素を溶出した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット 13000）にて濃縮し、引き続き 25 mM ビスートリス-イミノジ酢酸緩衝液（pH 7.1）にて洗浄し、脱塩した。

この脱塩濃縮液を同緩衝液にて平衡化したクロマトフォーカシング（カラム：Pharmacia Mono P HR5/20）に載せ、10% Polybuffer 74（Pharmacia 製、イミノジ酢酸にて pH 4.0 に調整したもの）で標的枝切り酵素を溶出した。活性画分を限外濾過膜（分子量カット

13000) にて濃縮し、引き続き 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) にて洗浄し、脱塩した。

この脱塩濃縮液を同緩衝液にて平衡化したイオン交換クロマトグラフィー (カラム: TOSOH TSK-gel DATE 5PW HPLC) に通した。カラムを同緩衝液にて洗浄し、次いで 30 ml の 0 M ~ 0.3 M 食塩の線状勾配で標的枝切り酵素を溶出した。活性画分を限外濾過膜 (分子量カット 13000) にて濃縮し、標的枝切り酵素の部分精製品 (液状品) を得た。

なお、上記の精製法における標的枝切り酵素の検出は、基質として 5% 可溶性デンプンを用い、

Sulfolobus solfataricus
KM1 株由来の精製アミラーゼ及び精製トランスフェラーゼのそれぞれ 2 Units / ml 及び 3.2 Units / ml を被検液と共に添加し、pH 5.5、60℃ にて反応させ、被検液の無添加の場合との比較において α , α -トレハロース生成量が増加する活性を指標として行った。

上記の精製法によって得られた *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来の部分精製枝切り酵素の活性は、1% 可溶性モチゴメデンプン 0.5 ml に 0.5 M 酢酸緩衝液 pH 5.0 を 0.1 ml、酵素液 0.1 ml を混合して 60℃ で反応させ、アミロース-ヨウ素複合体の青紫色による 610 nm の吸光度を 1 cm 幅のセルで測定し、1 時間に 0.1 増加させる酵素

量を 1 Unit と定義した。

以上の精製操作により部分精製された枝切り酵素の比活性は 495 Units / mg であった。

参考例 11-4 S u l f o l o b u s

s o l f a t a r i c u s K M 1 株由来枝切り酵素の
諸性質の検討

参考例 11-3 で得られた部分精製枝切り酵素の酵素学的諸性質を測定した。

(1) 作用及び基質特異性

以下の第 33 表に示す基質及び各活性測定法を用いて、各基質に対する反応性及び作用を調べた。

ジニトロサリチル酸法（澱粉・関連糖質酵素実験法、中村道徳・貝沼圭二、学会出版センター刊、1989 年）は、 α -1, 6 結合の加水分解反応による還元末端量の増加を定量する方法である。

ヨウ素呈色法は参考例 11-3 と同様に行い、 α -1, 6 結合の加水分解反応による直鎖状アミロースの増加を、アミロース-ヨウ素複合体の青紫色による 610 nm の吸光度増加によって定量する方法である。

液体クロマトグラフィーによる分解生成物の分析

(HPLC 法) は、実施例 11-1 に示した Bio-Rad AMINEX HPX-42A HPLC 分析法により行い、生じるオリゴ糖を調べた。

第33表

基質	活性測定法		
	ジニトロ	ヨウ素呈色法	HPLC法
	サリチル酸法		
プルラン	+++	-	マルトトリオース
可溶性澱粉	+	+	-
アミロペクチン	+	+	-
モチゴメデンプン	+	+	-

上記の結果から明らかなように、本枝切り酵素は、1) プルラン及び各種デンプンより、還元末端を生じさせ、2) 各種デンプンのヨウ素呈色度を増加させ、また、3) プルランよりマルトトリオースを生じさせうる。更にまた、4) 実施例II-14に示したように、可溶性デンプンを基質として用い、*Sulfolobus solfataricus* KM1株由来の精製アミラーゼ及び精製トランスフェラーゼと共に反応させた場合、本枝切り酵素を添加しない場合に比べて著しく α 、 α -トレハロース生成量を増加させる。よって、これらの事実から本酵素はデンプンやプルランの α -1, 6結合を加水分解することが理解される。

(2) 安定性

得られた部分精製酵素の各温度での3時間処理における安定性を第34表に示す。

第34表

処理温度 (°C)	活性残存率 (%)
50	109.1
60	73.3
65	6.1
70	0

本酵素は60℃で3時間の処理で73.3%の残存活性があった。

(3) 反応性

得られた部分精製酵素の各pH及び各温度における反応性を、それぞれ第35及び36表に示す。測定は、pH3～5の間はグリシン塩酸系緩衝液を、pH4～5.5の間は酢酸ナトリウム系緩衝液を、pH5～7.5の間は磷酸ナトリウム系緩衝液をそれぞれ用いた。

— 167 —

第 3 5 表

反 应 p H	相 对 活 性
	(%)
2 . 7	1 . 8
3 . 1	2 1 . 7
3 . 7	3 3 . 1
4 . 1	7 4 . 0
5 . 1	1 0 0 . 0
5 . 5	5 3 . 7
5 . 6	3 7 . 5
6 . 0	2 2 . 2
6 . 9	1 6 . 1
7 . 4	1 1 . 5
7 . 7	1 0 . 2

第 3 6 表

反 应 温 度	相 对 活 性
	(%)
4 0	5 3 . 8
5 0	8 7 . 0
6 0	9 7 . 6
6 5	1 0 0 . 0
7 0	5 1 . 4

本酵素は 60 ~ 65 °C 付近に反応最適温度、pH 4.0 ~ 5.5 付近に反応最適 pH を有する。

(4) 等電点

クロマトフォーカシングにより分離された枝切り酵素画分の pH 測定の結果、等電点は 4.4 であった。

(5) 各種活性化剤及び阻害剤の影響

以下の第 37 表に示す物質を基質と共に添加し、それぞれの場合の活性測定を参考例 11-3 と同様に行い、活性化又は阻害の有無を調べた。その結果、銅イオンにより阻害を受けることがわかった。糖関連酵素ではカルシウムイオンによって活性化される場合が多く認められるが、本酵素はカルシウムイオンによっては活性化されない。

第 37 表

活性化剤/阻害剤	濃度 (mM)	無添加に対する相対活性
control (無添加)	5	100.0
CaCl ₂	5	105.7
MgCl ₂	5	82.9
MnCl ₂	5	91.2
CuSO ₄	5	0.0
CoCl ₂	5	87.2
FeSO ₄	5	74.1
FeCl ₃	5	39.0
メルカプトエタノール	5	104.1
ジチオスレイトール	5	106.0

実施例 I - 9 S u l f o l o b u ss o l f a t a r i c u s K M 1 株 由 来 の 新 規 ト ラ ン
ス フ ェ ラ ー ゼ の 部 分 ア ミ ノ 酸 配 列 の 決 定

実施例 I - 2 で得られた精製酵素の部分アミノ酸配列の決定は岩松（生化学 63、139（1991））らの方法により行った。すなわち、精製された新規トランスフェラーゼを、泳動用緩衝液（10%グリセロール、2.5% SDS、2% 2-メルカプトエタノール、62 mM トリス塩酸緩衝液（pH 6.8））に懸濁し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動に供した。泳動後、当該酵素をゲルよりポリビニリデンジフロリド（PVDF）膜（Pro Blot、（アプライド、バイオシステムズ社））に、エレクトロブロッティング（ザルトプロット I I s 型（ザルトリウス社））を 160 mA で 1 時間行った。

転写後、当該酵素の転写された部分の膜を切りとり、約 300 μ l 還元用緩衝液（6 M グアニジン塩酸、0.5 M トリス塩酸緩衝液（pH 3.5）、0.3% EDTA、2% アセトニトリル）に浸し、これに 1 mg のジチオスレイトールを加え、アルゴン下で 60℃ / 約 1 時間の還元を行った。これに 2.4 mg モノヨード酢酸を 0.5 N 水酸化ナトリウム液 10 μ l に溶かしたものを加え、遮光下で 20 分間攪拌した。PVDF 膜を取り出し、2% アセトニトリルで十分洗浄した後、0.1

% S D S 中で 5 分間攪拌した。次に、P V D F 膜を水で軽く洗浄後、0.5% ポリビニルピロリドン-40、100 mM 酢酸に浸し 30 分放置した。この後 P V D F 膜を水で軽く洗浄し、約 1 mm 四方に切断した。これを消化用緩衝液（8% アセトニトリル、90 mM トリス塩酸緩衝液（pH 9.0））に浸し、

A c h r o m o b a c t e r P r o t e a s e

I（和光純薬社）を 1 p m o l 加え、室温で 15 時間消化した。この消化物を C8 カラム（日本ミリポアリミテッド社、 μ -B o n d a s h e r e 5 C 8、300 A、2.1 x 150 mm）を用いた逆相 H P L C により分離し、10 数種のペプチド断片を得た。ペプチドの溶出溶媒としては、A 溶媒（0.05% トリフルオロ酢酸）、B 溶媒（0.02% トリフルオロ酢酸を含む 2-プロパノール／アセトニトリル 7:3）を用い、B 溶媒に関し 2~50% の直線濃度勾配で 0.25 ml / 分の流速で 40 分間溶出させた。得られたペプチド断片について、気相ペプチドシーケンサー（アプライド バイオシステム社 モデル 470 型）を用いた自動エドマン分解法によりアミノ酸配列を決定した。

また A c h r o m o b a c t e r P r o t e a s e I で消化されたペプチド断片を更に A s p - N により 2 次消化し、得られたペプチド断片について上記の条件で同様に分離しアミノ酸配列を決定した。

その結果、部分アミノ酸配列は下記の通りであった。

Achromobacter protease 消化ペプチドフラグメント

AP-1 : Val Ile Arg Glu Ala Lys	(配列番号9)
AP-2 : Ile Ser Ile Arg Gln Lys	(配列番号10)
AP-3 : Ile Ile Tyr Val Glu	(配列番号11)
AP-4 : Met Leu Tyr Val Lys	(配列番号12)
AP-5 : Ile Leu Ser Ile Asn Glu Lys	(配列番号13)
AP-6 : Val Val Ile Leu Thr Glu Lys	(配列番号14)
AP-7 : Asn Leu Glu Leu Ser Asp Pro Arg Val Lys	(配列番号15)
AP-8 : Met Ile Ile Gly Thr Tyr Arg Leu Gln Leu Asn Lys	(配列番号16)
AP-9 : Val Ala Val Leu Phe Ser Pro Ile Val	(配列番号17)
AP-10 : Ile Asn Ile Asp Glu Leu Ile Ile Gln Ser Lys	(配列番号18)
AP-11 : Glu Leu Gly Val Ser His Leu Tyr Leu Ser Pro Ile	(配列番号19)

Asp-N 消化ペプチドフラグメント

DN-1 : Asp Glu Val Phe Arg Glu Ser	(配列番号20)
DN-2 : Asp Tyr Phe Lys	(配列番号21)
DN-3 : Asp Gly Leu Tyr Asn Pro Lys	(配列番号22)
DN-4 : Asp Ile Asn Gly Ile Arg Glu Cys	(配列番号23)
DN-5 : Asp Phe Glu Asn Phe Glu Lys	(配列番号24)
DN-6 : Asp Leu Leu Arg Pro Asn Ile	(配列番号25)
DN-7 : Asp Ile Ile Glu Asn	(配列番号26)
DN-8 : Asp Asn Ile Glu Tyr Arg Gly	(配列番号27)

実施例 I - 10 S u l f o l o b u s s o l f a t
a r i c u s K M 1 株 染 色 体 D N A の 調 製

S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
K M 1 株の菌体は実施例 I - 2 の方法に従って得た。

この菌体の 1 g に 25 % スクロース、1 m g / m l リ
ゾチーム、1 m M E D T A、150 m M N a C l を含む
50 m M のトリス塩酸緩衝液 (p H 8 . 0) 10 m l を
加え懸濁し、室温にて 30 分放置した。これに 10 %
S D S 0 . 5 m l、及び 10 m g / m l プロテイナー
ゼ K (和光純薬社製) 0 . 2 m l を加え、50 °C で 2 時
間放置した。次にこの溶液をフェノール / クロロホルム
で抽出し、水相をとりこれをエタノール沈殿させた。沈
殿してきた D N A を滅菌したガラス棒で巻きとり、これ
を 70 % エタノールで洗浄した後、減圧乾燥した。最終
的に 1 . 5 m g の染色体 D N A が得られた。

実施例 I - 11 部分アミノ酸配列に基づく D N A プロ
ープの作成および P C R 法によるプローブの確認

実施例 I - 9 により決定された S u l f o l o b u s
s o l f a t a r i c u s K M 1 株由来新規トランス
フェラーゼの部分アミノ酸配列の情報をもとにオリゴヌ
クレオチド D N A プライマーを D N A 合成装置 (アプラ
イドバイオシステムズ社製モデル 381) によって作成
した。その配列は下記の通りであった。

- 173 -

DN-1

アミノ酸配列 N末端 AspGluValPheArgGluSer C末端

DNAプライマー 5' TTCACGAAAAACCTCATC 3' (配列番号28)

塩基配列 C T TG T T

DN-8

アミノ酸配列 N末端 AspAsnIleGluTyrArgGly C末端

DNAプライマー 5' GATAACATAGAATACAGAGG 3' (配列番号29)

塩基配列 T T G T G

このDNAプライマーを各々100 pmolおよび実施例I-10で調製された*Sulfolobus solfataricus* KM1株の染色体DNA 100 ngを用いてPCR法を実施した。PCR装置はパーキンエルマー社製、GeneAmp PCRシステムモデル9600を用い、1サイクルを94℃で30秒、50℃で1分および72℃で2分で行い、サイクル数30回および総液量100 μlで実施した。

得られた反応液10 μlを1%アガロース電気泳動により分析した。その結果約1.2 kbの長さを持つDNA断片が特異的に増幅された。

このPCR産物の末端を平滑化し、pUC118のHincII部位にサブクローニングした。このプラスミドの挿入断片のDNA配列をアプライド・バイオシステムズ社製、DNAシーケンサ/GENESCANモ

デル 373 A を用いて決定した。その結果、実施例 I - 9 で得られたアミノ酸配列に相当する DNA 配列が見いだされた。

実施例 I - 12 S u l f o l o b u s

s o l f a t a r i c u s K M 1 株由来新規トランス
フェラーゼ遺伝子のクローニング

実施例 I - 10 で調製された S u l f o l o b u s
s o l f a t a r i c u s K M 1 株の染色体 DNA
100 μ g を制限酵素 S a u 3 A I で部分消化した。反応液をスクロース密度勾配を用いて超遠心で 5 ~ 10
k b の DNA 断片を分離精製した。一方、プラスミドベ
クター p U C 1 1 8 を B a m H I で消化し、アルカリホ
スファターゼにより末端を脱リン酸化したものと、上記
5 ~ 10 k b の長さを持つ S u l f o l o b u s

s o l f a t a r i c u s K M 1 株の染色体 DNA 断
片を T 4 DNA リガーゼにより連結（ライゲーション）
した。この挿入断片を含む p U C 1 1 8 プラスミドベク
ターを含んだ混合液を用いて、E . c o l i J M 1
09 細胞を形質転換した。これを 50 μ g / m l アンピ
シリンを含む LB 寒天プレート培地に蒔きコロニーを形
成させ、DNA ライブラリーを作成した。

この DNA ライブラリーにおける新規トランスフェラ
ーゼ遺伝子を含む組換えプラスミドのスクリーニングは、
P C R 法により以下のように行った。

まず、コロニーをかき取り T E 緩衝液に懸濁した。これを 100 °C にて 5 分間処理し菌体を破碎し、実施例 I - 11 に記載の方法で P C R 法を実施した。

次いで得られた P C R 反応液 10 μ l を 1 % アガロース電気泳動により分析し、約 1.2 k b の長さを持つ D N A 断片が増幅されてくるクローンを陽性クローンとした。

その結果、600 個の形質転換体から 1 個の陽性クローンを得た。そこから抽出されたプラスミドを解析したところ約 8 k b の挿入断片を有していた。このプラスミドを「p K T 1」と称した。

更に挿入断片を制限酵素 S a u 3 A I で部分消化し、上記の方法と同様に P C R 法を実施して、挿入断片を縮小化した。その結果約 3.8 k b および約 4.5 k b の挿入断片を有するプラスミドを保持する形質転換体を得た。これらのプラスミドをそれぞれ「p K T 2 1」、「p K T 1 1」と称した。

これらのプラスミドの挿入断片の制限酵素地図は図 26 に示される通りであった。

なお、以上の実施例で使用された制限酵素としては、全て市販品（宝酒造株式会社より購入）を利用した。

実施例 I - 13 S u l f o l o b u ss o l f a t a r i c u s K M 1 株由来新規トランス
フェラーゼ遺伝子の D N A 配列の決定

実施例 I - 12 で得られたプラスミド p K T 11、
p K T 21 中の挿入断片の共通部分の D N A 塩基配列を
決定した。

まず、このプラスミド D N A を宝酒造社製、キロシー
クエンス用デレーションキットを用いて、デレーション
プラスミドを作成した。次いでこのプラスミドの挿入断
片の D N A 配列をパーキンエルマージャパン社製、P R
I S M, S e q u e n a s e D y e P r i m e r
S e q u e n c i n g キット、T a q D y e
D e o x y T M T e r m i n a t o r C y c l e
S e q u e n c i n g K i t およびアプライド バイ
オシステムズ社製、D N A シークエンサ / G E N E S C
A N モデル 373 A を用いて決定した。

共通配列中の S p h I - p K T 21 の末端間（図 26
の A, B 間）の塩基配列およびそこから推定されるアミ
ノ酸配列は配列番号 1 および 2 に示される通りであった。

このアミノ酸配列中に実施例 I - 9 で得られた部分ア
ミノ酸配列に相当する配列が全て認められた。このアミ
ノ酸配列は長さが 728 個で、推定分子量 82 k D a の
タンパク質をコードしているものと考えられた。この分
子量は S u l f o l o b u s

s o l f a t a r i c u s K M 1 株由来新規トランスフェラーゼの精製酵素を S D S - P A G E にかけることによって得られた分子量の値にほぼ一致した。

実施例 I - 1 4 形質転換体における新規トランスフェラーゼの発現

実施例 I - 1 2 で得られた p K T 2 1 について S p h I および X b a I で切断し、同酵素で切断した p U C 1 1 9 (宝酒造社製) に連結したものを p K T 2 2 とした。図 2 7 にその手段を示した。p K T 2 2 に挿入された新規トランスフェラーゼ遺伝子を含む断片中、マルチクローニングサイトを除く塩基配列は、配列番号 1 の塩基番号 1 ~ 2 5 7 8 の配列であった。

このプラスミドを含む形質転換体の新規トランスフェラーゼ活性を次のように調べた。まず、形質転換体を 1 0 0 μ g / m l のアンピシリンを含む L B 培地で 3 7 $^{\circ}$ C で、1 晩培養した。遠心分離により集菌し、- 8 0 $^{\circ}$ C にて保存した。菌体の収率は 1 0 g / リットルであった。

上記のようにして得られた菌体 1 0 g を 5 m M の E D T A を含む 5 0 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 5 . 5) 4 0 m l に懸濁し、0 $^{\circ}$ C で 3 分間、超音波破碎処理により溶菌し、次いで遠心分離を行い上清溶液を得た。これを 7 5 $^{\circ}$ C で 3 0 分間熱処理し、再度遠心を行い、限外濾過膜 (分子量カット 1 3 0 0 0) にて濃縮して、粗酵素液 (6 U n i t / m l) として、基質であるマルトトリオース

を最終的に 10% となるように加えた。pH 5.5

(50 mM 酢酸ナトリウム) で、60℃で24時間反応させた後、100℃で5分間加熱処理して反応を停止させた。生成したグルコシルトレハロースを実施例 I-1 におけるのと同様の HPLC 分析法により測定した。

HPLC 分析の結果は図 28 に示される通りであった。主反応物は HPLC チャート上ではアノマーのない一本のピークとして、未反応基質よりやや遅れて現れた。また、この主生成物を TSK-gel amide-80 HPLC column にて分取し、¹H-NMR、¹³C-NMR により解析の結果、グルコシルトレハロースであることを確認した。

この結果、形質転換体は *Sulfolobus solfatarius* KM1 株由来の新規トランスフェラーゼ活性を有することがわかった。また JM109 に pUC119 のみを入れた形質転換体からは新規トランスフェラーゼ活性は検出されなかった。

実施例 I-15 *Sulfolobus*

acidocaldarius ATCC 33909

株由来の新規トランスフェラーゼの部分アミノ酸配列の決定

実施例 I-4 で得られた新規トランスフェラーゼの部分アミノ酸配列の決定は実施例 I-9 に記載される方法に従って行った。以下に決定された部分アミノ酸配列を示す。

Achromobacter protease 消化ペプチドフラグメント

AP-6	: Arg Asn Pro Glu Ala Tyr Thr Lys	(配列番号30)
AP-8	: Asp His Val Phe Gln Glu Ser His Ser	(配列番号31)
AP-10	: Ile Thr Leu Asn Ala Thr Ser Thr	(配列番号32)
AP-12	: Ile Ile Ile Val Glu Lys	(配列番号33)
AP-13	: Leu Gln Gln Tyr Met Pro Ala Val Tyr Ala Lys	(配列番号34)
AP-14	: Asn Met Leu Glu Ser	(配列番号35)
AP-16	: Lys Ile Ser Pro Asp Gln Phe His Val Phe Asn Gln Lys	(配列番号36)
AP-18	: Gln Leu Ala Glu Asp Phe Leu Lys	(配列番号37)
AP-19	: Lys Ile Leu Gly Phe Gln Glu Glu Leu Lys	(配列番号38)
AP-20	: Ile Ser Val Leu Ser Glu Phe Pro Glu Glu	(配列番号39)
AP-23	: Leu Lys Leu Glu Glu Gly Ala Ile Tyr	(配列番号40)
AP-28	: Glu Val Gln Ile Asn Glu Leu Pro	(配列番号41)

Asp-N 消化ペプチドフラグメント

DN-1	: Asp His Ser Arg Ile	(配列番号42)
DN-5	: Asp Leu Arg Tyr Tyr Lys	(配列番号43)
DN-6	: Asp Val Tyr Arg Thr Tyr Ala Asn Gln Ile Val Lys Glu Cys	(配列番号44)

実施例 I - 16 S u l f o l o b u sa c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9 株由来の新規トランスフェラーゼのクローニング

S u l f o l o b u s

a c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9 株

の染色体 DNA は実施例 I - 4 の方法に従って得た菌体より実施例 I - 10 の方法に従って得た。上記染色体 DNA を S a u 3 A I で部分消化した後、E M B L 3 B a m H I 切断アーム (S T R A T A G E N E 社製) に、T 4 D N A リガーゼにより連結 (ライゲーション) した。パッケージングは S T R A T A G E N E 社製 G i g a p a c k I I G o l d を用いて行った。上記ライブラリーを大腸菌 L E 3 9 2 に 37℃ 15 分間感染させた後、N Z Y 寒天プレート培地に播種し、37℃で約 8 から 12 時間程度培養して、プラークを形成させた。約 2 時間、4℃で保存した後、ナイロンメンブレン (アマシャム社製, H y b o n d N +) へ DNA を吸着させた。2 x S S P E で軽く洗浄した後、80℃で 2 時間ベーキングを行った。プローブは実施例 I - 14 で得られた p K T 2 2 の E c o R I - X b a I 断片 (配列番号 1 の 8 2 4 番より 2 5 7 8 番へ対応する) を用い、アマシャム社製 メガプライム DNA 標識システムを用いて ³²P で標識した。

ハイブリダイゼーションの条件は 6 x S S P E 、0.5% S D S で 60℃オーバーナイトでおこなった。洗浄は 2 x S S P E 、0.5% S D S で、室温 10 分、2 回行った。

約 5000 クローンからスクリーニングを開始して 8 個の陽性クローンを得た。このクローンより約 7.6 k

b p の B a m H I 断片を得て、これを p U C 1 1 8 の上記サイトへ挿入した。このプラスミドを「p 0 9 T 3」と称する。さらに上記クローンの挿入断片を S a u 3 A I で部分消化し、得られた約 6 . 7 k b p の断片を p U C 1 1 8 の B a m H I サイトへ挿入した。このプラスミドを「p 0 9 T 2」と称する。このプラスミドより約 3 . 8 k b p の X b a I 断片について p U C 1 1 8 の上記サイトへ挿入した。このプラスミドを「p 0 9 T 1」と称する。このプラスミドの挿入断片の制限酵素地図を図 2 9 に示す。またその作成方法を図 3 0 に示す。上記 p 0 9 T 1 について新規トランスフェラーゼをコードしている領域を中心に実施例 I - 1 3 の方法に従って塩基配列の決定を行った。決定された塩基配列およびそこから推定されるアミノ酸配列は配列番号 3 および 4 に示される通りである。このアミノ酸配列中に実施例 I - 1 5 で得られた部分アミノ酸配列に相当する配列が全て認められた。このアミノ酸配列は長さが 6 8 0 個で、推定分子量 8 0 . 1 k D a のタンパク質をコードしているものと考えられた。この分子量は S u l f o l o b u s a c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9 株由来新規トランスフェラーゼの精製酵素を S D S - P A G E にかけることによって得られた分子量の値にほぼ一致した。またプラスミド p 0 9 T 1 を含む形質転換体について実施例 I - 1 4 の方法に従って新規トランス

フェラーゼ活性を確認した。

実施例 I - 17 S u l f o l o b u s

s o l f a t a r i c u s K M 1 株由来の新規トラン
スフェラーゼ遺伝子と他の生物種の染色体 D N A とのハ
イブリダイゼーション試験

S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
D S M 5 8 3 3 株、S u l f o l o b u s
s h i b a t a e D S M 5 3 8 9 株、E . c o l i
J M 1 0 9 株の染色体 D N A を実施例 I - 1 0 に準じた
方法で得て、これを制限酵素 P s t I および E c o R I
で消化した。

この消化物を 1 % アガロースゲル電気泳動にて分離し、
アマシャムジャパン社製、H y b o n d - N にサザンプ
ロットティングした。このメンブレンに実施例 I - 1 2 で
得られた p K T 2 1 の約 2 . 6 k b p の S p h I 、
X b a I 断片（配列番号 1 に示される配列に対応、
図 2 6 における A ~ B 間の範囲に対応）を、ベーリンガ
ーマンハイム社製、D I G システムキットによって標識
し、これを用いてハイブリダイゼーションを行った。

条件はハイブリダイゼーション：5 x S S C、4 0 °C、
2 時間、洗浄：2 x S S C（0 . 1 % S D S を含む）、
4 0 °C、5 分、2 回 0 . 1 x S S C（0 . 1 % S D S
を含む）、4 0 °C、5 分、2 回であった。

その結果、S p h I、X b a I 断片は、

Sulfolobus solfataricus
DSM 5833 株については約 5.9 kbp の断片と、
Sulfolobus shibatae DSM
5389 株については約 5.0 kbp および約 0.8
kbp の断片とそれぞれハイブリッドを形成した。一方、
ネガティブコントロールである *E. coli* JM109
株については、ハイブリッドの形成は観察されなかつた。

さらに *Sulfolobus*
solfataricus KM1 株、DSM 5354
株、DSM 5833 株、ATCC 35091 株、ATCC
35092 株、*Sulfolobus*
acidocaldarius ATCC 33909 株、
ATCC 49426 株、*Sulfolobus*
shibatae DSM 5389 株、
Acidianus briarleyi DSM 16
51 株 *E. coli* JM109 株の染色体 DNA を
実施例 I-10 方法に準じて得、制限酵素 *HindIII*、
XbaI、*EcoRV* で消化した。

この消化物を 1% アガロースゲル電気泳動にて分離し、
アマシャムジャパン社、Hybond-N+ にブロッテ
ィングした。このメンブレンに配列番号 1 の 1880 番
より 2257 番の領域 (378 bp) を PCR にて増幅
し、実施例 I-16 の方法に従って 32 P で標識し、これ

を用いてハイブリダイゼーションを行った。

条件はハイブリダイゼーション：6 x S S P E、
0.5% S D S で 60℃、オーバーナイトで、洗浄：
2 x S S P E、0.1% S D S で室温、10分、2回行
った。

その結果、S u l f o l o b u s
s o l f a t a r i c u s K M 1 株、D S M 5 3 5 4
株、D S M 5 8 3 3 株、A T C C 3 5 0 9 1 株、A T C
C 3 5 0 9 2 株、S u l f o l o b u s
a c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9 株、
A T C C 4 9 4 2 6 株、S u l f o l o b u s
s h i b a t a e D S M 5 3 8 9 株、
A c i d i a n u s b r i e r l e y i D S M 1 6
5 1 株について、それぞれ約 4.4 k b p、3.7 k b
p、3.7 k b p、0.8 k b p、3.9 k b p、
0.8 k b p、0.8 k b p、4.4 k b p、2.1 k
b p の部位でハイブリッドを形成することが判明した。
一方 J M 1 0 9 のゲノム D N A については結合が観察さ
れなかった。

また配列番号 1、2、3 および 4 の範囲に含まれるア
ミノ酸配列、塩基配列と相同性を有する配列が存在しな
いことを、アミノ酸配列データベース (S w i s s
p r o t、及び N B R F - P D B)、塩基配列データ
バンク (E M B L) から、配列解析ソフト ジェネティ

ックス（ソフトウェア開発）を用いて確認した。よってこの新規トランスフェラーゼ遺伝子は *Sulfolobales* 目に属する古細菌に特異的に高度に保存されていることがわかった。

実施例 I - 18 *Sulfolobus*

solfataricus KM1 株 および

Sulfolobus

acidocaldarius ATCC 33909

株由来の新規トランスフェラーゼの塩基配列、アミノ酸配列の比較

配列番号 2 の KM1 株由来の新規トランスフェラーゼのアミノ酸配列と配列番号 4 の ATCC 33909 株由来の新規トランスフェラーゼのアミノ酸配列とを、また配列番号 1 の KM1 株由来の新規トランスフェラーゼの塩基配列と配列番号 3 の ATCC 33909 株由来の新規トランスフェラーゼの塩基配列とを配列解析ソフト、ジェネティックス（ソフトウェア開発）を用いてギャップを考慮した解析を行った。アミノ酸配列についての結果を図 3 1 に、塩基配列についての結果を図 3 2 に示した。それぞれの図中上段に ATCC 33909 株の配列を、下段に KM1 株の配列を示し、中段の（*）は両者で一致する配列を、また（.）は両者で性質の似たアミノ酸配列であることを示す。相同性はアミノ酸配列レベルで 49%、塩基配列レベルで 57% であった。

実施例 I - 19 形質転換体由来組換え新規トランスフェラーゼを用いたマルトオリゴ糖混合物からのトレハロースオリゴ糖の製造

可溶性デンプン（ナカライテスク社製、特級品）の α -アミラーゼ分解物であってヨウ素デンプン反応を示さずオリゴ糖にまで分解されたもの（ α -アミラーゼは、Sigma 社製の A-0273 アスペルギルス・オリゼ由来のものを用いた）を基質とした。

実施例 I - 14 で得た粗酵素液、および上記基質を用いて、実施例 I - 14 の反応条件に従いグルコシルトレハロースおよび各種のマルトオリゴシルトレハロースの製造を試みた。反応液の分析は以下に示す条件の HPLC 分析法により行った。

カラム : BIORAD AMINEX HPX-42A (7.8 × 300mm)

溶媒 : 水

流速 : 0.6 ml/min

温度 : 85 °C

検出器 : 示差屈折計

図 33 (A) に HPLC による分析の結果を (B) に組換え新規トランスフェラーゼを添加しない場合の HPLC 分析の結果を示した。その結果、反応生成物のオリゴ糖類は対照のアミラーゼのみによる生成物よりも各々保持時間が短かった。また、基質マルトトリオース (G3)、マルトテトラオース (G4) およびマルトペンタオース

(G 5) (いずれも林原バイオケミカル社製) からの主生成物である 3 糖、4 糖および 5 糖を TSK-gel amide-80 HPLC column にて分取し、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ により解析を行った。その結果、いずれも還元末端のグルコース残基 1 個が $\alpha-1$, $\alpha-1$ で結合した構造を示し、それぞれグルコシルトレハロース ($\alpha-D$ -マルトシル $\alpha-D$ -グルコピラノシド)、マルトシルトレハロース ($\alpha-D$ -マルトトリオシル $\alpha-D$ -グルコピラノシド) およびマルトトリオシルトレハロース ($\alpha-D$ -マルトテトラオシル $\alpha-D$ -グルコピラノシド) であることが確認された。

実施例 I-20 形質転換体由来組換え新規トランスフェラーゼを用いたグルコシルトレハロースおよびマルトオリゴシルトレハロースの製造

基質を 100 mM のマルトトリオース (G 3) ~ マルトヘプタオース (G 7) (いずれも林原バイオケミカル社製) とし、実施例 I-14 で得られた粗酵素液を凍結乾燥した後、50 mM 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.5) に懸濁し、濃縮酵素とした。この濃縮酵素 12.7 Unit/ml (マルトトリオースを基質として作用させたときの酵素活性) をそれぞれの基質に作用させ、対応する $\alpha-1$, $\alpha-1$ 転移体を生成させた。各生成物の分析法は実施例 I-1 の方法に従って行い、その収率および酵素活性を調べた。結果は第 38 表に示される通りであった。

なお、第 38 表中での酵素活性は、マルトオリゴ糖を 1 時間に $1 \mu\text{mol}$ の対応する $\alpha - 1$, $\alpha - 1$ 転移体に変換する酵素活性を 1 Unit として示した。

第 38 表

基質	酵素活性	収 率
	(Unit/ml)	(%)
マルトトリオース (G 3)	12.7	40.8
マルトテトラオース (G 4)	72.5	69.8
マルトペンタオース (G 5)	103.5	65.3
マルトヘキサオース (G 6)	87.3	66.5
マルトヘプタオース (G 7)	60.2	67.9

実施例 11-15 S u l f o l o b u ss o l f a t a r i c u s K M 1 株由来の新規アミラーゼの部分アミノ酸配列の決定

実施例 11-2 で得られた精製酵素の部分アミノ酸配列の決定は岩松ら（生化学 63、139（1991））の方法により、また N 末端アミノ酸配列の決定は Matsudaira T（J. Biol. Chem. 262, 10035-10038（1987））の方法により行った。

まず精製された新規アミラーゼを、泳動用緩衝液（10%グリセロール、2.5%SDS、2%2-メルカプトエタノール、62mMトリス塩酸緩衝液（pH 6.8））に懸濁し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動に供した。泳動後、当該酵素をゲルよりポリビニリデンジフロリド（PVDF）膜（ProBlot、アプライドバイオシステムズ社製）に、160mA で1時間エレクトロブロッティング（ザルトプロット I I s 型、ザルトリウス社製）することにより転写を行った。

転写した後、当該酵素の転写された部分の膜を切りとり、約 300 μ l 還元用緩衝液（6Mグアニジン塩酸、0.5Mトリス塩酸緩衝液（pH 3.5）、0.3% EDTA、2%アセトニトリル）に浸し、これに1mg のジチオスレイトールを加え、アルゴン下で60℃/約1時間の還元を行った。これに2.4mgモノヨード酢酸を0.5N水酸化ナトリウム液10 μ l に溶かしたも

のを加え、遮光下で20分間攪拌した。P V D F膜を取り出し、2%アセトニトリルで十分洗浄した後、0.1% S D S 中で5分間攪拌した。次いで、P V D F膜を水で軽く洗浄した後、0.5%ポリビニルピロリドン-40を含む100mM酢酸に浸し30分間放置した。この後P V D F膜を水で軽く洗浄し、約1mm四方に切断した。N末端アミノ酸配列についてはこの切断した膜を直接気相シーケンサーで分析した。部分アミノ酸配列についてはこの切断した膜を消化用緩衝液（8%アセトニトリル、90mMトリス塩酸緩衝液（pH 9.0））に浸し、A c h r o m o b a c t e r P r o t e a s e I（和光純薬工業社製）を1pmol加え、室温で15時間かけて消化した。この消化物をC8カラム（日本ミリポアリミテッド社製、 μ -B o n d a s h e r e 5 C 8、300A、2.1 x 150mm）を用いた逆相H P L Cにより分離し、10数種のペプチド断片を得た。ペプチドの溶出溶媒としては、A溶媒（0.05%トリフルオロ酢酸）およびB溶媒（0.02%トリフルオロ酢酸を含む2-プロパノール／アセトニトリル 7：3）を用い、溶出はB溶媒に関し2～50%の直線濃度勾配で0.25ml／分の流速で40分間溶出させることにより行った。得られたペプチド断片についてのアミノ酸配列の決定は、気相ペプチドシーケンサー（アプライドバイオシステムズ社

製、モデル 470 型) を用いた自動エドマン分解法により行った。

決定された N 末端アミノ酸配列および部分アミノ酸配列は下記の通りであった。

N末端アミノ酸配列

Thr Phe Ala Tyr Lys Ile Asp Gly Asn Glu

(配列番号45)

部分アミノ配列

P-6 : Leu Gly Pro Tyr Phe Ser Gln

(配列番号46)

P-7 : Asp Val Phe Val Tyr Asp Gly

(配列番号47)

P-10 : Tyr Asn Arg Ile Val Ile Ala Glu Ser Asp Leu

(配列番号48)

Asn Asp Pro Arg Val Val Asn Pro

実施例 II-16 S u l f o l o b u s

s o l f a t a r i c u s K M 1 株 染 色 体 D N A の 調

製

S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
K M 1 株を、2 g / リットルの可溶性デンプンおよび 2
g / リットルの酵母エキスを含む A m e r i c a n
T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n
(A T C C) 発行 C a t a l o g u e o f
B a c t e r i a a n d P h a g e s 18 版,
1992 に記載の培地番号 1304 の培地で、75℃で
3 日間培養した。遠心分離により集菌し、-80℃にて
保存した。菌体の収率は 3.3 g / リットルであった。

この菌体 1 g に 25% スクロース、1 mg / ml リゾ

チーム、1 mM EDTA および 150 mM NaCl を含む 50 mM のトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 10 ml を加えて懸濁し、室温にて 30 分間放置した。これに 10% SDS 0.5 ml および 10 mg/ml プロテイナーゼ K (和光純薬工業社製) 0.2 ml を加え、37℃ で 2 時間放置した。次にこの溶液をフェノール/クロロホルムで抽出し、エタノール沈澱させた。沈澱した DNA を滅菌したガラス棒で巻きとり、これを 70% エタノールで洗浄した後、減圧乾燥した。最終的に 1.5 mg の染色体 DNA が得られた。

実施例 II-17 S u l f o l o b u s

s o l f a t a r i c u s K M 1 株由来新規アミラーゼ遺伝子の活性染色法による発現クローニング

実施例 II-16 で調製された S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s K M 1 株の染色体 DNA 100 μ g を制限酵素 S a u 3 A I で部分消化した。反応液をショ糖密度勾配遠心分離法を用いて分画し、5 ~ 10 kb の DNA 断片を分離精製した。一方プラスミドベクター p U C 1 1 8 (宝酒造社製) を B a m H I で消化し、アルカリホスファターゼにより末端を脱リン酸化し精製したものと、上記 5 ~ 10 kb の染色体 DNA 断片を T 4 DNA リガーゼにより連結 (ライゲーション) した。この挿入断片を含んだ p U C 1 1 8 プラスミドベクターを含んだ混合液を用いて、大腸菌 J M 1 0 9 細胞

(宝酒造社製) を形質転換した。これを $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含む LB 寒天プレート培地に播種しコロニーを形成させて、DNA ライブラリーを作成した。

Sulfolobus solfataricus KM1 株由来新規アミラーゼ遺伝子を含む組換えプラスミドを有する形質転換体のスクリーニングは活性染色法により行った。

まず、得られた形質転換体を濾紙にレプリカし、LB 寒天培地上にてコロニーを形成させ、この濾紙を $1 \text{ mg}/\text{ml}$ リゾチーム (生化学工業社製)、 1 mM EDTA を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 ($\text{pH } 7.5$) 溶液に浸し 30 分間放置した。次いで 1% Triton-X 100 溶液に 30 分間浸して、溶菌させ、 60°C で 1 時間熱処理して、宿主由来の酵素を失活させた。この処理した濾紙を 0.2% 可溶性デンプンを含む寒天プレートにのせて 60°C にて一晩反応を行った。反応させたプレートをヨウ素の蒸気下に置いてデンプンを発色させ、ハローを形成したコロニーを陽性クローンとした。その結果、6000 個の形質転換体から 5 個の陽性クローンを得た。そこからプラスミドを抽出したところ最も挿入断片の短いものは約 4.3 kb の挿入断片を有していた。

そこでこの挿入断片を更に制限酵素 BamHI で消化し、更に上記の方法と同様にして、挿入断片を縮小化した。その結果 3.5 kb の挿入断片を有するプラスミド

を保持する形質転換体を得た。このプラスミドを「p K A 1」と称した。

このプラスミドの挿入断片の制限酵素地図は図 3 4 に示される通りであった。

実施例 11-18 S u l f o l o b u s

s o l f a t a r i c u s K M 1 株由来新規アミラーゼ遺伝子の D N A 配列の決定

実施例 11-17 で得られたプラスミド p K A 1 中の挿入断片の（後記する p K A 2 に対応する領域の）D N A 塩基配列を決定した。

まず、このプラスミド D N A を宝酒造社製、キロシーケンス用デレーションキットを用いて、デレーションプラスミドを作成した。次いでこのプラスミドの挿入断片の D N A 配列をパーキンエルマー・ジャパン社製、P R I S M , S e q u e n a s e D y e P r i m e r S e q u e n c i n g キット、T a q D y e D e o x y TM T e r m i n a t o r C y c l e S e q u e n c i n g k i t およびアプライド バイオシステムズ社製、D N A シークエンサー / G E N E S C A N モデル 3 7 3 A を用いて決定した。

塩基配列およびそれから推定されるアミノ酸配列は配列番号 5 および 6 に示される通りであった。

このアミノ酸配列中に実施例 11-15 で得られた部分アミノ酸配列全てが認められた。このアミノ酸配列は長

さが 558 個で、推定分子量 64.4 kDa のタンパク質をコードしているものと考えられた。この分子量は *Sulfolobus solfataricus* KM1 株由来アミラーゼの精製酵素の SDS-PAGE による分子量の測定値 61.0 kDa にほぼ一致した。

実施例 II-19 形質転換体における組換え新規アミラーゼの発現

実施例 II-17 で得られた pKA1 について制限酵素 Pst I で部分消化したものを pKA2 とした。図 35 はその制限酵素地図を示したものである。pKA2 を含む形質転換体の活性は次のようにして調べた。まず上記形質転換体を 100 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 培地で 37℃ で一晚培養した。遠心分離により集菌した菌体を 1g あたり 4 ml の pH 5.5 (5.0 mM 酢酸ナトリウム緩衝液) へ懸濁し、超音波破碎処理および遠心分離を行ない、その上清を 70℃ で 1 時間熱処理し、宿主のアミラーゼを失活させた。遠心分離により沈澱物を除去し、限外濾過膜 (分子量カット 13,000) で濃縮したものを粗酵素液として、以下の実験に用いた。

(1) 基質特異性

前記粗酵素液 35.2 Units/ml (ここで 1 Unit とは、マルトリオシルトレハロースを基質として作用させたときの酵素活性で、反応条件は実施例 II-1 に従い、1 時間にマルトリオシルトレハロースから α , α -トレ

ハロースを $1 \mu\text{mol}$ 生成する活性として定義した) を、以下の第 39 表に示す 10 mM の基質 (アミロペクチン、可溶性デンプンについては 3.0%) に作用させ、分解性及び分解生成物の分析を行った。各種マルトオリゴ糖、アミロース DP-17、アミロペクチン、可溶性デンプン、各種イソマルトオリゴ糖、及びパノースについては単糖 + 2 糖の生成活性を指標として、また、各種トレハロースオリゴ糖、アミロース DP-17 $\alpha-1$, $\alpha-1$ 転移体 (アミロース DP-17 の還元末端側の、1 つ目と 2 つ目のグルコース残基間の結合が $\alpha-1$, $\alpha-1$ であるオリゴ糖) については α , α -トレハロースの生成活性を指標として、マルトース及び α , α -トレハロースについてはグルコースの生成活性を指標として実施例 11-1 に示した TSK-gel Amide-80 HPLC による分析法で分析を行った。

なお、表中での酵素活性は、各々単糖及び 2 糖を 1 時間に $1 \mu\text{mol}$ 遊離する酵素活性を 1 Unit として示した。

結果は以下の第 39 表に示される通りであった。

第39表

基質	生成オリゴ糖	単糖+ 2糖生成速度 (Units/ml)
マルトース (G 2)	グルコース	0. 1 5
マルトトリオース (G 3)	グルコース+G2	0. 2 7
マルトテトラオース (G 4)	グルコース+G2+G3	0. 2 6
マルトペンタオース (G 5)	グルコース+G2+G3+G4	2. 1 2
アミロース DP-17	グルコース+G2	2. 4 5
アミロペクチン	グルコース+G2	0. 2 0
可溶性デンプン	グルコース+G2	0. 3 5
α , α -トレハロース	分解せず	0
グルコシルトレハロース	グルコース+ トレハロース	0. 0 1
マルトシルトレハロース	G2+ トレハロース	4. 5 2
マルトトリオシルトレハロース	G3+ トレハロース	3 5. 2 1
アミロース DP-17 α -1, α -1転移体	トレハロース	4. 9 2
イソマルトース	分解せず	0
イソマルトトリオース	分解せず	0
イソマルトテトラオース	分解せず	0
イソマルトペンタオース	分解せず	0
パノース	分解せず	0

マルトトリオシルトレハロースからの反応生成物の実施例 II-1 の条件に従って行った TSK-gel Amide-80 HPLC による分析結果は図 36 (A) に示される通りであった。また、可溶性デンプンからの反応生成物を、以下の条件で行った AMINEX HPX-42A HPLC による分析結果は図 36 (B) に示される通りであった。

カラム : AMINEX HPX-42A (7.8 X 300mm)

溶媒 : 水

流速 : 0.6 ml/min

温度 : 85 °C

検出器 : 示差屈折計

以上の結果より、本酵素に関しては還元末端側のグルコース残基が $\alpha-1$, $\alpha-1$ 結合したマルトトリオシルトレハロース等のトレハロースオリゴ糖に、極めてよく作用し、 α , α -トレハロースと重合度が 2 つ減少した対応するマルトオリゴ糖を生成することが確認された。またマルトース (G2) ~ マルトペンタオース (G5)、アミロース、可溶性デンプンからは、主としてグルコースまたはマルトースを遊離することが確認された。しかしながら α , α -トレハロース、イソマルトース、イソマルトトリオース、イソマルトテトラオース、イソマルトペンタオース、およびパノースに対してはいずれも反応しなかった。

(2) エンド型アミラーゼ活性

前記粗酵素液 150 Unit/ml (活性単位は上記(1)と同様)を可溶性デンプンに作用させた。実施例 I-1 に示したデンプン分解活性測定法と同様の条件でヨウ素発色の消失を測定し、また上記(1)に示した基質特異性を決定する際の条件の HPLC 分析法の条件に従って単糖、および2糖の生成量を測定した。これらからデンプン加水分解率を求めた。

その経時変化は図37に示される通りであった。図から、ヨウ素反応呈色度が50%消失した時点でのデンプンの加水分解率は4.5%と低く、従って本粗酵素はエンド型アミラーゼの性質を示すことが確認された。

(3) 作用機作の検討

ウリジンジホスホグルコース [グルコース-6-³H]、およびマルトテトラオースにグリコーゲンシンターゼ (ウサギ骨格筋由来、Sigma 社製 G-2259) を作用させ、非還元末端のグルコース残基を ³H で放射能ラベルしたマルトペンタオースを合成し、これを分取精製した。

次にこの放射能ラベルした 10 mM のマルトペンタオースを基質とし、前記実施例 I-20 で得られた組換え新規トランスフェラーゼ (10 Unit/ml : 活性単位は実施例 I-1 に従った) を添加し、60℃、3時間作用させ、非還元末端のグルコース残基を ³H で放射能ラベルしたマルトトリオシルトレハロースを合成し、これを分

取精製した。なお、この生成物にグルコアミラーゼ

(*Rhizopus*由来、生化学工業社製)を作用させ、グルコースと α , α -トレハロースに完全に分解した。これらを薄相クロマトグラフィーにて分取しそれぞれ液体シンチレーションカウンターで放射能を測定したところ、 α , α -トレハロース画分に放射活性は見られず、グルコース画分に放射活性が回収され、非還元末端のグルコース残基が放射能ラベルされている事を確認した。

以上のように調製した、非還元末端のグルコース残基が ^3H で放射能ラベルされたマルトペンタオース、および非還元末端のグルコース残基が ^3H で放射能ラベルされたマルトトリオシルトレハロースを基質として、これに上記粗酵素液をそれぞれ30 Units/ml 及び10 Units/ml作用させた。反応前、および6-0℃、3時間後に反応物をサンプリングした。この反応物を薄相クロマトグラフィー(Kieselgel 60メルク社製、溶媒; ブタノール: エタノール: 水 = 5 : 5 : 3)で展開した。得られた各糖に相当するところを分取し液体シンチレーションカウンターで放射能を測定したところ、マルトペンタオースを基質とした場合、加水分解産物であるグルコース、マルトース画分には放射活性は見られず、マルトテトラオース、マルトトリオース画分に放射活性が回収された。またマルトトリオシルトレハロースを基質とした場合、加水分解産物である α , α -トレハロース画分に

は放射活性は見られず、マルトトリオース画分に放射活性が回収された。

以上の結果より、本組換え新規アミラーゼの作用機作はエンド型に作用するアミラーゼ活性と共に、還元末端側から主に単糖、2糖を生成する活性を有することが確認された。

なお、以上の実施例で用いた試薬の入手先は、それぞれ α 、 α -トレハロース：Sigma 社、マルトース（G2）：和光純薬社、マルトトリオース～マルトペンタオース（G3～G5）：林原バイオケミカル社、アミロースDP17：林原バイオケミカル社、イソマルトース：和光純薬社、イソマルトトリオース：和光純薬社、イソマルトテトラオース：生化学工業社、イソマルトペンタオース：生化学工業社、パノース：東京化成社、アミロペクチン：ナカライテスク社である。

実施例 11-20 S u l f o l o b u s

a c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9 株

由来新規アミラーゼの部分アミノ酸配列の決定

実施例 11-4 で得た精製酵素の部分アミノ酸配列の決定は実施例 11-15 に記載される方法に従って行った。部分アミノ酸配列は下記の通りであった。

— 202 —

AP-9 Leu Asp Tyr Leu Lys (配列番号49)

AP-10 Lys Arg Glu Ile Pro Asp Pro Ala Ser Arg Tyr Gln Pro Leu Gly Val His
(配列番号50)

AP-11 Lys Asp Val Phe Val Tyr Asp Gly Lys (配列番号51)

AP-12 His Ile Leu Gln Glu Ile Ala Glu Lys (配列番号52)

AP-16 Lys Leu Trp Ala Pro Tyr Val Asn Ser Val (配列番号53)

AP-17 Met Phe Ser Phe Gly Gly Asn (配列番号54)

AP-18 Asp Tyr Try Tyr Gln Asp Phe Gly Arg Ile Glu Asp Ile Glu (配列番号55)

AP-21 Lys Ile Asp Ala Gln Trp Val (配列番号56)

実施例 11-21 S u l f o l o b u s

a c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9 株

新規アミラーゼ 部分アミノ酸配列に基づくDNAプ

ロープの作成

実施例 11-20 により決定された部分アミノ酸配列の情報を基にオリゴヌクレオチドDNAプライマーをDNA合成装置（アプライドバイオシステムズ社モデル381）によって作成した。その配列は下記の通りであった。

— 203 —

AP-10

アミノ酸配列 N末端 Pro Ala Ser Arg Tyr Gln Pro C末端

DNAプライマー5' AGCTAGTAGATATCAACC 3' (配列番号57)

塩基配列 A G C C G

AP-11

(相補鎖)

アミノ酸配列 N末端 Asp Val Phe Val Tyr Asp Gly Lys C末端

DNAプライマー5' TTTTCCATCATAAACAAAAACATC3'

(配列番号58)

塩基配列 C A G T G T

C

このプライマーを各々100 pmolおよび実施例II-4の方法に従って得た菌体より実施例II-16の方法に従って調製された *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909株の染色体DNA約100 ngを用いてPCRを行った。PCR装置はパーキンエルマー社製 Gene Amp PCR システム モデル9600を用い、1サイクル94℃30秒、54℃30秒、72℃30秒で行いサイ

クル数 30 回および総液量 100 μ l で実施した。約 830 bp の増幅断片を pT7 Blue T-Vector (Novagen 社製) へサブクローニングした。このプラスミドの挿入断片の塩基配列を決定したところ実施例 II-20 で得られたアミノ酸配列に相当する配列が見いだされた。

実施例 II-22 S u l f o l o b u s

a c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9 株

由来新規アミラーゼ遺伝子のクローニング

S u l f o l o b u s
a c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9 株
の染色体 DNA は実施例 II-4 の方法に従って得た菌体より、実施例 II-16 の方法に従って得た。上記染色体 DNA を制限酵素 S a u 3 A I で部分消化した後、
E M B L 3 B a m H I 切断アーム (S T R A T A G E N E 社製) に T 4 D N A リガーゼにより連結 (ライゲーション) した。パッケージングは S T R A T A G E N E 社製, G i g a p a c k I I G o l d を用いて行った。
上記ライブラリーを大腸菌 L E 3 9 2 に 37 °C 15 分感染させた後、N Z Y 寒天プレート培地に播種し、37 °C で約 8 から 12 時間程度培養して、プラークを形成させた。約 2 時間、4 °C で保存した後、ナイロンメンブレン (アマシャム社製、H y b o n d N +) へ DNA を吸着させた。2 x S S P E で軽く洗浄した後 80 °C 2 時間

ベーキングを行った。プローブは実施例II-21のPCR断片を用い、アマシャム社製メガプライムDNA標識システムを用いて³²Pで標識した。

ハイブリダイゼーションの条件は6 x S S P E、0.5% S D Sで65℃オーバーナイトで行った。洗浄は2 x S S P E、0.1% S D Sで、室温10分、2回行った。

約8000クローンからスクリーニングを開始して17個の陽性クローンを得た。このクローンより約5.4 k b pのB a m H I断片を得て、これをp U C 1 18の上記サイトへ挿入した。得られたプラスミドをp 0 9 A 2と命名した。このプラスミドDNAをさらに制限酵素S a c Iで消化したものをp 0 9 A 1とする。p 0 9 A 1の挿入断片の制限酵素地図を図38に、またp 0 9 A 1の作成方法を図39に記す。上記p 0 9 A 1についてP h a r m a c i a社製, d o u b l e - s t r a n d N e s t e d D e l a t i o n K i tを用いてデレーションプラスミドを作成した。実施例II-18の方法に従って新規アミラーゼの構造遺伝子の領域を中心にDNA配列を決定した。これらのDNA配列およびそこから推定されるアミノ酸配列は配列番号7および配列番号8にそれぞれ示される通りであった。

このアミノ酸配列中に実施例II-20で得られた部分アミノ酸配列に相当する配列が全て認められた。このア

ミノ酸配列は長さが556個で、推定分子量64.4 kDaのタンパク質をコードしているものと考えられた。この分子量は*Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909株由来新規アミラーゼの精製酵素をSDS-PAGEにかけることによって得られた分子量の値にほぼ一致した。またプラスミドp09A1を含む形質転換体について実施例II-19の方法に従って新規アミラーゼ活性を確認した。

実施例II-23 KM1株とATCC 33909株の上記酵素のアミノ酸配列、塩基配列の相同性について

配列番号6のKM1株由来の新規アミラーゼのアミノ酸配列と、配列番号8のATCC 33909株由来の新規アミラーゼのアミノ酸配列とを、また配列番号5のKM1株由来の新規アミラーゼの塩基配列と、配列番号7のATCC 33909株由来の新規アミラーゼの塩基配列とを、配列解析ソフト、ジェネティックス（ソフトウェア開発）を用いてギャップを考慮してそれぞれ解析した。アミノ酸配列についての結果を図40に、塩基配列についての結果を図41に示す。それぞれの図中下段にKM1株の配列を、上段にATCC 33909株の配列結果を示し、中段の（*）は両者で一致する配列を、また中段の（.）は両者で性質の似たアミノ酸を示す。相同性はアミノ酸レベルで約59%、塩基配列レベルで

64%であった。

実施例 11-24 *Sulfolobus*

solfataricus KM1株 および

Sulfolobus acidocaldarius

ATCC 33909株由来新規アミラーゼ遺伝子の他の
生物種の染色体DNAとのハイブリダイゼーション試験

Sulfolobus solfataricus

DSM 5833株、*Sulfolobus*

shibatae DSM 5389株、

Acidianus briarleyi DSM

1651株、*E. coli* JM109株の染色体DNA

Aを実施例 11-16の方法に準じて制限酵素 *Hind*

IIIで消化した。。

この消化物を1%アガロースゲル電気泳動にて分離し、
アマシャムジャパン社製、Hybond-Nにサザンブ
ロットティングした。このメンブレンにプラスミドpKA
1の約1.9 kbpの *Pst*I断片（配列番号5の1番
から1845番までの配列に対応する）をベーリンガー
マンハイム社製、DIGシステムキットによって標識し、
これを用いてハイブリダイゼーションを行った。

条件はハイブリダイゼーション：5 x SSC、40℃、
3時間、洗浄：2 x SSC（0.1% SDSを含む）、
40℃、5分、2回 0.1 x SSC（0.1% SDS
を含む）、40℃、5分、2回であった。

その結果、P s t I断片は、S u l f o l o b u s
s o l f a t a r i c u s D S M 5 8 3 3株について
は約13.0 k b pの断片と、S u l f o l o b u s
s h i b a t a e D S M 5 3 8 9株については約
9.8 k b pの断片と、A c i d i a n u s
b r i e r l e y i D S M 1 6 5 1株については約
1.9 k b pの断片とハイブリッドを形成した。一方、
ネガティブコントロールであるE. c o l i J M 1 0
9株については、ハイブリッドの形成は観察されなかつ
た。

またS u l f o l o b u s
s o l f a t a r i c u s K M 1株、D S M 5 3 5 4
株、D S M 5 8 3 3株、A T C C 3 5 0 9 1株、A T C
C 3 5 0 9 2株、S u l f o l o b u s
a c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9株、
A T C C 4 9 4 2 6株、S u l f o l o b u s
s h i b a t a e D S M 5 3 8 9株、
A c i d i a n u s b r i e r l e y i D S M 1 6
5 1株、E. c o l i J M 1 0 9株の染色体D N Aを
実施例II-16の方法に従って得、制限酵素X b a I,
H i n d I I I, E c o R Vで消化した。この消化物を
1%アガロースゲル電気泳動にて分離し、アマシャム社
製、H y b o n d N+にサザンブロッティングした。
このメンブレンに配列番号7番の1393番より212

1 番の領域（実施例 11-22 で得られた p 0 9 A 1 より制限酵素 E c o T 2 2 I と E c o R V で消化し、ゲルから回収した）をプローブとして実施例 11-22 の方法に従い 32 P によって標識し、これを用いてハイブリダイゼーションを行った。条件はハイブリダイゼーション 6 x S S P E、0.5% S D S、60℃でオーバーナイトで行った。洗浄は 2 x S S P E、0.1% S D S で室温 10 分、2 回行った。その結果 S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s K M 1 株、D S M 5 3 5 4 株、D S M 5 8 3 3 株、A T C C 3 5 0 9 1 株、A T C C 3 5 0 9 2 株 S u l f o l o b u s a c i d o c a l d a r i u s A T C C 3 3 9 0 9 株、A T C C 4 9 4 2 6 株 S u l f o l o b u s s h i b a t a e D S M 5 3 8 9 株 A c i d i a n u s b r i e r l e y i D S M 1 6 5 1 株の染色体 D N A はそれぞれ約 3.6 k b p, 1.0 k b p, 0.9 k b p、0.9 k b p、1.0 k b p、0.9 k b p、0.9 k b p、1.4 k b p、0.9 k b p の部位でハイブリッドを形成した。一方 E. c o l i J M 1 0 9 株の染色体 D N A とはハイブリッドを形成しなかった。また配列番号 5、6、7、および 8 の範囲内に含まれるアミノ酸配列、塩基配列と相同性を有する配列が存在しないことをアミノ酸データベース（S w i s s p r o t, 及び N B R F - P D B）、

塩基配列データベース (EMBL) から、配列解析ソフト、ジェネティックス (ソフトウェア開発) を用いて確認した。よってこの新規アミラーゼ遺伝子は *Sulfolobales* 目に属する古細菌に特異的に高度に保存されていることがわかった。

実施例 III - 1 組換え新規アミラーゼおよび組換え新規トランスフェラーゼを用いた α , α -トレハロースの製造

実施例 II - 19 で得られた粗精製組換え新規アミラーゼおよび実施例 I - 20 で得られた濃縮組換え新規トランスフェラーゼ並びに 10% 可溶性デンプン (ナカライテスク社製、特級品) を用い、プルラナーゼを補助的に添加して、 α , α -トレハロースの製造を試みた。反応は以下のように行った。

まず 10% 可溶性デンプンを 0.5 ~ 50 Unit/ml のプルラナーゼ (*Klebsiella pneumoniae* 由来: 和光純薬社製) で、40℃ で 1 時間処理した後、上記組換え新規トランスフェラーゼ (10 Unit/ml) と、上記組換え新規アミラーゼ (150 Unit/ml) とを添加し、pH 5.5、60℃ で 100 時間反応させた。次いで反応液を 100℃ で 5 分間加熱処理して反応を停止し、未反応の基質をグルコアミラーゼにて分解した。その後、実施例 II - 1 に示す条件の HPLC 分析法により測定した。

TSK-gel Amide-80 HPLC による分析結果は図42に示される通りであった。

ここで、組換え新規アミラーゼの酵素活性は1時間に1 μmol の α , α -トレハロースをマルトトリオシルトレハロースから遊離する活性を1 Unitとして示した。組換え新規トランスフェラーゼの酵素活性はマルトトリオースを1時間に1 μmol のグルコシルトレハロースに変換する活性を1 Unitとして示した。プルラナーゼの酵素活性の定義は、pH 6.0、30℃で1分間にプルランから1 μmol のマルトトリオースを生成する酵素量を1 Unitとして示した。

プルラナーゼの添加量50 Unit/mlの際 α , α -トレハロースの収率は67%であった。この値は、組換え新規アミラーゼが、*Sulfolobus solfataricus* KM1株由来精製新規アミラーゼを上記条件で作用させた場合とほぼ同様の収率を与えることを示している。

産業上の利用可能性

本発明の新規な精製法に基づく酵素製造法により得られるマルトオリゴ糖等の糖に作用してグルコシルトレハロース及びマルトオリゴシルトレハロースなどのトレハロースオリゴ糖等を生成する能力を有する新規トランスフェラーゼを用いることにより、マルトオリゴ糖等の原料を用いて効率的で、かつ高収率にグルコシルトレハロース及びマルトオリゴシルトレハロースなどのトレハロースオリゴ糖等を製造する新規な方法を提供することができる。

本発明の新規アミラーゼを、本発明の新規トランスフェラーゼと組み合わせて用いることにより、デンプン、デンプン分解物、及びマルトオリゴ糖等の糖質原料から効率的に、かつ高収率に α 、 α -トレハロースを製造する新規な方法を提供することができる。

— 213 —

配 列 表

配列番号 : 1

配列の長さ : 2578

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物 : *Sulfolobus solfataricus*

株名 : KM1

配列

GCATGCCATT AAAAGATGTA ACATTTTACA CTCCAGACGG TAAGGAGGTT GATGAGAAAG 60
 CATGGAATTC CCCAACGCAA ACTGTTATTT TCGTGTTAGA GGGGAGCGTA ATGGATGAGA 120
 TTAACATCTA TGGAGAGAGA ATTGCGGATG ATTCATTCTT GATAATTCTT AACGCAAATC 180
 CCAATAACGT AAAAGTGAAG TTCCCAAAGG GTAAATGGGA ACTAGTTGTT GGTTCCTTATT 240
 TGAGAGAGAT AAAACCAGAA GAAAGAATTG TAGAAGGTGA GAAGGAATTG GAAATTGAGG 300
 GAAGAACAGC ATTAGTTTAT AGGAGGACAG AACT ATG ATA ATA GGC ACA TAT AGG 355

Met Ile Ile Gly Thr Tyr Arg

1

5

CTG CAA CTC AAT AAG AAA TTC ACT TTT TAC GAT ATA ATA GAA AAT TTG 403

Leu Gln Leu Asn Lys Lys Phe Thr Phe Tyr Asp Ile Ile Glu Asn Leu

10

15

20

— 214 —

GAT TAT TTT AAA GAA TTA GGA GTA TCA CAC CTA TAT CTA TCT CCA ATA 451

(Asp) Tyr Phe Lys (Glu) Leu Gly Val Ser His Leu Tyr Leu Ser Pro (Ile)

25

30

35

CTT AAG GCT AGA CCA GGG AGC ACT CAC GGC TAC GAT GTA GTA GAT CAT 499

Leu Lys Ala Arg Pro Gly Ser Thr His Gly Tyr Asp Val Val Asp His

40

45

50

55

AGT GAA ATT AAT GAG GAA TTA GGA GGA GAA GAG GGG TGC TTT AAA CTA 547

Ser Glu Ile Asn Glu Glu Leu Gly Gly Glu Glu Gly Cys Phe Lys Leu

60

65

70

GTT AAG GAA GCT AAG AGT AGA GGT TTA GAA ATC ATA CAA GAT ATA GTG 595

Val Lys Glu Ala Lys Ser Arg Gly Leu Glu Ile Ile Gln Asp Ile Val

75

80

85

CCA AAT CAC ATG GCG GTA CAT CAT ACT AAT TGG AGA CTT ATG GAT CTG 643

Pro Asn His Met Ala Val His His Thr Asn Trp Arg Leu Met Asp Leu

90

95

100

TTA AAG AGT TGG AAG AAT AGT AAA TAC TAT AAC TAT TTT GAT CAC TAC 691

Leu Lys Ser Trp Lys Asn Ser Lys Tyr Tyr Asn Tyr Phe Asp His Tyr

105

110

115

GAT GAT GAC AAG ATA ATC CTC CCA ATA CTT GAG GAC GAG TTG GAT ACC 739

Asp Asp Asp Lys Ile Ile Leu Pro Ile Leu Glu Asp Glu Leu Asp Thr

120

125

130

135

GTT ATA GAT AAG GGA TTG ATA AAA CTA CAG AAG GAT AAT ATA GAG TAC 787

Val Ile Asp Lys Gly Leu Ile Lys Leu Gln Lys Asp Asn Ile Glu Tyr

140

145

150

— 215 —

AGA GGG CTT ATA TTA CCT ATA AAT GAT GAA GGA GTT GAA TTC TTG AAA 835

Arg Gly Leu Ile Leu Pro Ile Asn Asp Glu Gly Val Glu Phe Leu Lys

155

160

165

AGG ATT AAT TGC TTT GAT AAT TCA TGT TTA AAG AAA GAG GAT ATA AAG 883

Arg Ile Asn Cys Phe Asp Asn Ser Cys Leu Lys Lys Glu Asp Ile Lys

170

175

180

AAA TTA CTA TTA ATA CAA TAT TAT CAG CTA ACT TAC TGG AAG AAA GGT 931

Lys Leu Leu Leu Ile Gln Tyr Tyr Gln Leu Thr Tyr Trp Lys Lys Gly

185

190

195

TAT CCA AAC TAT AGG AGA TTT TTC GCA GTA AAT GAT TTG ATA GCT GTT 979

Tyr Pro Asn Tyr Arg Arg Phe Phe Ala Val Asn Asp Leu Ile Ala Val

200

205

210

215

AGG GTA GAA TTG GAT GAA GTA TTT AGA GAG TCC CAT GAG ATA ATT GCT 1027

Arg Val Glu Leu Asp Glu Val Phe Arg Glu Ser His Glu Ile Ile Ala

220

225

230

AAG CTA CCA GTT GAC GGT TTA AGA ATT GAC CAC ATA GAT GGA CTA TAT 1075

Lys Leu Pro Val Asp Gly Leu Arg Ile Asp His Ile Asp Gly Leu Tyr

235

240

245

AAC CCT AAG GAG TAT TTA GAT AAG CTA AGA CAG TTA GTA GGA AAT GAT 1123

Asn Pro Lys Glu Tyr Leu Asp Lys Leu Arg Gln Leu Val Gly Asn Asp

250

255

260

AAG ATA ATA TAC GTA GAG AAG ATA TTG TCA ATC AAC GAG AAA TTA AGA 1171

Lys Ile Ile Tyr Val Glu Lys Ile Leu Ser Ile Asn Glu Lys Leu Arg

265

270

275

— 216 —

GAT GAT TGG AAA GTA GAT GGG ACT ACT GGA TAT GAT TTC TTG AAC TAC 1219
 Asp Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Thr Gly Tyr Asp Phe Leu Asn Tyr
 280 285 290 295
 GTT AAT ATG CTA TTA GTA GAT GGA AGT GGT GAG GAG GAG TTA ACT AAG 1267
 Val Asn Met Leu Leu Val Asp Gly Ser Gly Glu Glu Glu Leu Thr Lys
 300 305 310
 TTT TAT GAG AAT TTC ATT GGA AGG AAA ATC AAT ATA GAC GAG TTA ATA 1315
 Phe Tyr Glu Asn Phe Ile Gly Arg Lys Ile Asn Ile Asp Glu Leu Ile
 315 320 325
 ATA CAA AGT AAA AAA TTA GTT GCA AAT CAG TTA TTT AAA GGT GAC ATT 1363
 Ile Gln Ser Lys Lys Leu Val Ala Asn Gln Leu Phe Lys Gly Asp Ile
 330 335 340
 GAA AGA TTA AGC AAG TTA CTG AAC GTT AAT TAC GAT TAT TTA GTA GAT 1411
 Glu Arg Leu Ser Lys Leu Leu Asn Val Asn Tyr Asp Tyr Leu Val Asp
 345 350 355
 TTT CTA GCA TGT ATG AAA AAA TAC AGG ACT TAT TTA CCA TAT GAG GAT 1459
 Phe Leu Ala Cys Met Lys Lys Tyr Arg Thr Tyr Leu Pro Tyr Glu Asp
 360 365 370 375
 ATT AAC GGA ATA AGG GAA TGC GAT AAG GAG GGA AAG TTA AAA GAT GAA 1507
 Ile Asn Gly Ile Arg Glu Cys Asp Lys Glu Gly Lys Leu Lys Asp Glu
 380 385 390
 AAG GGA ATC ATG AGA CTC CAA CAA TAC ATG CCA GCA ATC TTC GCT AAG 1555
 Lys Gly Ile Met Arg Leu Gln Gln Tyr Met Pro Ala Ile Phe Ala Lys
 395 400 405

— 217 —

GGC TAT GAG GAT ACT ACC CTC TTC ATC TAC AAT AGA TTA ATT TCC CTT 1603

Gly Tyr Glu Asp Thr Thr Leu Phe Ile Tyr Asn Arg Leu Ile Ser Leu

410

415

420

AAC GAG GTT GGG AGC GAC CTA AGA AGA TTC AGT TTA AGC ATC AAA GAC 1651

Asn Glu Val Gly Ser Asp Leu Arg Arg Phe Ser Leu Ser Ile Lys Asp

425

430

435

TTT CAT AAC TTT AAC CTA AGC AGA GTA AAT ACC ATA TCA ATG AAC ACT 1699

Phe His Asn Phe Asn Leu Ser Arg Val Asn Thr Ile Ser Met Asn Thr

440

445

450

455

CTT TCC ACT CAT GAT ACT AAA TTC AGT GAA GAC GTT AGA GCT AGA ATA 1747

Leu Ser Thr His Asp Thr Lys Phe Ser Glu Asp Val Arg Ala Arg Ile

460

465

470

TCA GTA CTA TCT GAG ATA CCA AAG GAG TGG GAG GAG AGG GTA ATA TAC 1795

Ser Val Leu Ser Glu Ile Pro Lys Glu Trp Glu Glu Arg Val Ile Tyr

475

480

485

TGG CAT GAT TTG TTA AGG CCA AAT ATT GAT AAA AAC GAT GAG TAT AGA 1843

Trp His Asp Leu Leu Arg Pro Asn Ile Asp Lys Asn Asp Glu Tyr Arg

490

495

500

TTT TAT CAA ACA CTT GTG GGA AGT TAC GAG GGA TTT GAT AAT AAG GAG 1891

Phe Tyr Gln Thr Leu Val Gly Ser Tyr Glu Gly Phe Asp Asn Lys Glu

505

510

515

AGA ATT AAG AAC CAC ATG ATT AAG GTC ATA AGA GAA GCT AAG GTA CAT 1939

Arg Ile Lys Asn His Met Ile Lys Val Ile Arg Glu Ala Lys Val His

520

525

530

535

— 218 —

ACA ACG TGG GAA AAT CCT AAT ATA GAG TAT GAA AAG AAG GTT CTG GGT	1987
Thr Thr Trp Glu Asn Pro Asn Ile Glu Tyr Glu Lys Lys Val Leu Gly	
540 545 550	
TTC ATA GAT GAA GTG TTC GAG AAC AGT AAT TTT AGA AAT GAT TTT GAA	2035
Phe Ile Asp Glu Val Phe Glu Asn Ser Asn Phe Arg Asn Asp Phe Glu	
555 560 565	
AAT TTT GAA AAG AAA ATA GTT TAT TTC GGT TAT ATG AAA TCA TTA ATC	2083
Asn Phe Glu Lys Lys Ile Val Tyr Phe Gly Tyr Met Lys Ser Leu Ile	
570 575 580	
GCA ACG ACA CTT AGG TTC CTT TCG CCC GGT GTA CCA GAT ATT TAT CAA	2131
Ala Thr Thr Leu Arg Phe Leu Ser Pro Gly Val Pro Asp Ile Tyr Gln	
585 590 595	
GGA ACT GAA GTT TGG AGA TTC TTA CTT ACA GAC CCA GAT AAC AGA ATG	2179
Gly Thr Glu Val Trp Arg Phe Leu Leu Thr Asp Pro Asp Asn Arg Met	
600 605 610 615	
CCG GTG GAT TTC AAG AAA CTA AAG GAA TTA TTA AAT AAT TTG ACT GAA	2227
Pro Val Asp Phe Lys Lys Leu Lys Glu Leu Leu Asn Asn Leu Thr Glu	
620 625 630	
AAG AAC TTA GAA CTC TCA GAT CCA AGA GTC AAA ATG TTA TAT GTT AAG	2275
Lys Asn Leu Glu Leu Ser Asp Pro Arg Val Lys Met Leu Tyr Val Lys	
635 640 645	
AAA TTG CTA CAG CTT AGA AGA GAG TAC TCA CTA AAC GAT TAT AAA CCA	2323
Lys Leu Leu Gln Leu Arg Arg Glu Tyr Ser Leu Asn Asp Tyr Lys Pro	
650 655 660	

— 219 —

TTG CCC TTT GGC TTC CAA AGG GGA AAA GTA GCT GTC CTT TTC TCA CCA 2371

Leu Pro Phe Gly Phe Gln Arg Gly Lys Val Ala Val Leu Phe Ser Pro

665

670

675

ATA GTG ACT AGG GAG GTT AAA GAG AAA ATT AGT ATA AGG CAA AAA AGC 2419

Ile Val Thr Arg Glu Val Lys Glu Lys Ile Ser Ile Arg Gln Lys Ser

680

685

690

695

GTT GAT TGG ATC AGA AAT GAG GAA ATT AGT AGT GGA GAA TAC AAT TTA 2467

Val Asp Trp Ile Arg Asn Glu Glu Ile Ser Ser Gly Glu Tyr Asn Leu

700

705

710

AGT GAG TTG ATT GGG AAG CAT AAA GTC GTT ATA TTA ACT GAA AAA AGG 2515

Ser Glu Leu Ile Gly Lys His Lys Val Val Ile Leu Thr Glu Lys Arg

715

720

725

GAG TGA ACTACCT ACATAGATTT ATTCTTGAAC TACTCTGGTC AGAAATGTAT 2568

Glu

TACGCAGATC

2578

配列番号 : 2

配列の長さ : 728

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物 : *Sulfolobus solfataricus*

— 220 —

株名: KM1

配列

Met	Ile	Ile	Gly	Thr	Tyr	Arg	Leu	Gln	Leu	Asn	Lys	Lys	Phe	Thr	Phe
1				5					10					15	
Tyr	Asp	Ile	Ile	Glu	Asn	Leu	Asp	Tyr	Phe	Lys	Glu	Leu	Gly	Val	Ser
				20				25					30		
His	Leu	Tyr	Leu	Ser	Pro	Ile	Leu	Lys	Ala	Arg	Pro	Gly	Ser	Thr	His
				35				40					45		
Gly	Tyr	Asp	Val	Val	Asp	His	Ser	Glu	Ile	Asn	Glu	Glu	Leu	Gly	Gly
				50				55					60		
Glu	Glu	Gly	Cys	Phe	Lys	Leu	Val	Lys	Glu	Ala	Lys	Ser	Arg	Gly	Leu
65					70				75					80	
Glu	Ile	Ile	Gln	Asp	Ile	Val	Pro	Asn	His	Met	Ala	Val	His	His	Thr
				85					90				95		
Asn	Trp	Arg	Leu	Met	Asp	Leu	Leu	Lys	Ser	Trp	Lys	Asn	Ser	Lys	Tyr
				100				105					110		
Tyr	Asn	Tyr	Phe	Asp	His	Tyr	Asp	Asp	Asp	Lys	Ile	Ile	Leu	Pro	Ile
				115				120					125		
Leu	Glu	Asp	Glu	Leu	Asp	Thr	Val	Ile	Asp	Lys	Gly	Leu	Ile	Lys	Leu
				130				135					140		
Gln	Lys	Asp	Asn	Ile	Glu	Tyr	Arg	Gly	Leu	Ile	Leu	Pro	Ile	Asn	Asp
145					150				155					160	
Glu	Gly	Val	Glu	Phe	Leu	Lys	Arg	Ile	Asn	Cys	Phe	Asp	Asn	Ser	Cys
					165				170					175	

— 221 —

Leu Lys Lys Glu Asp Ile Lys Lys Leu Leu Leu Ile Gln Tyr Tyr Gln

180

185

190

Leu Thr Tyr Trp Lys Lys Gly Tyr Pro Asn Tyr Arg Arg Phe Phe Ala

195

200

205

Val Asn Asp Leu Ile Ala Val Arg Val Glu Leu Asp Glu Val Phe Arg

210

215

220

Glu Ser His Glu Ile Ile Ala Lys Leu Pro Val Asp Gly Leu Arg Ile

225

230

235

240

Asp His Ile Asp Gly Leu Tyr Asn Pro Lys Glu Tyr Leu Asp Lys Leu

245

250

255

Arg Gln Leu Val Gly Asn Asp Lys Ile Ile Tyr Val Glu Lys Ile Leu

260

265

270

Ser Ile Asn Glu Lys Leu Arg Asp Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Thr

275

280

285

Gly Tyr Asp Phe Leu Asn Tyr Val Asn Met Leu Leu Val Asp Gly Ser

290

295

300

Gly Glu Glu Glu Leu Thr Lys Phe Tyr Glu Asn Phe Ile Gly Arg Lys

305

310

315

320

Ile Asn Ile Asp Glu Leu Ile Ile Gln Ser Lys Lys Leu Val Ala Asn

325

330

335

Gln Leu Phe Lys Gly Asp Ile Glu Arg Leu Ser Lys Leu Leu Asn Val

340

345

350

Asn Tyr Asp Tyr Leu Val Asp Phe Leu Ala Cys Met Lys Lys Tyr Arg

355

360

365

— 222 —

Thr Tyr Leu Pro Tyr Glu Asp Ile Asn Gly Ile Arg Glu Cys Asp Lys

370

375

380

Glu Gly Lys Leu Lys Asp Glu Lys Gly Ile Met Arg Leu Gln Gln Tyr

385

390

395

400

Met Pro Ala Ile Phe Ala Lys Gly Tyr Glu Asp Thr Thr Leu Phe Ile

405

410

415

Tyr Asn Arg Leu Ile Ser Leu Asn Glu Val Gly Ser Asp Leu Arg Arg

420

425

430

Phe Ser Leu Ser Ile Lys Asp Phe His Asn Phe Asn Leu Ser Arg Val

435

440

445

Asn Thr Ile Ser Met Asn Thr Leu Ser Thr His Asp Thr Lys Phe Ser

450

455

460

Glu Asp Val Arg Ala Arg Ile Ser Val Leu Ser Glu Ile Pro Lys Glu

465

470

475

480

Trp Glu Glu Arg Val Ile Tyr Trp His Asp Leu Leu Arg Pro Asn Ile

485

490

495

Asp Lys Asn Asp Glu Tyr Arg Phe Tyr Gln Thr Leu Val Gly Ser Tyr

500

505

510

Glu Gly Phe Asp Asn Lys Glu Arg Ile Lys Asn His Met Ile Lys Val

515

520

525

Ile Arg Glu Ala Lys Val His Thr Thr Trp Glu Asn Pro Asn Ile Glu

530

535

540

Tyr Glu Lys Lys Val Leu Gly Phe Ile Asp Glu Val Phe Glu Asn Ser

545

550

555

560

— 2 2 3 —

Asn Phe Arg Asn Asp Phe Glu Asn Phe Glu Lys Lys Ile Val Tyr Phe

565

570

575

Gly Tyr Met Lys Ser Leu Ile Ala Thr Thr Leu Arg Phe Leu Ser Pro

580

585

590

Gly Val Pro Asp Ile Tyr Gln Gly Thr Glu Val Trp Arg Phe Leu Leu

595

600

605

Thr Asp Pro Asp Asn Arg Met Pro Val Asp Phe Lys Lys Leu Lys Glu

610

615

620

Leu Leu Asn Asn Leu Thr Glu Lys Asn Leu Glu Leu Ser Asp Pro Arg

625

630

635

640

Val Lys Met Leu Tyr Val Lys Lys Leu Leu Gln Leu Arg Arg Glu Tyr

645

650

655

Ser Leu Asn Asp Tyr Lys Pro Leu Pro Phe Gly Phe Gln Arg Gly Lys

660

665

670

Val Ala Val Leu Phe Ser Pro Ile Val Thr Arg Glu Val Lys Glu Lys

675

680

685

Ile Ser Ile Arg Gln Lys Ser Val Asp Trp Ile Arg Asn Glu Glu Ile

690

695

700

Ser Ser Gly Glu Tyr Asn Leu Ser Glu Leu Ile Gly Lys His Lys Val

705

710

715

720

Val Ile Leu Thr Glu Lys Arg Glu

725

— 224 —

配列番号：3

配列の長さ：3467

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物：Sulfolobus acidocaldarius

株名：ATCC 33909株

配列

GCTAATAAAC TGAACAATGA GGACGGAATG AATGAAAATT ATAGCTGGAA TTGTGGAGTA	60
GAAGGAGAAA CTAACGATTC TAATATTCTT TATTGTAGAG AAAAACAAG AAGAAATTTT	120
GTAATAACAT TATTTGTTAG CCAAGGTATA CCAATGATCT TAGGGGAGA CGAAATAGGA	180
AGAACACAAA AAGGCAACAA TAATGCTTTT TGTCAGGATA ATGAGACAAG TTGGTATGAT	240
TGGAACCTTG ATGAAAATCG TGTAAGGTTT CATGATTTTG TGAGGAGACT TACCAATTTT	300
TATAAAGCTC ATCCGATATT TAGGAGGGCT AGATATTTTC AGGGTAAGAA GTTACACGGT	360
TCCCCATTAA AGGATGTGAC GTGGCTAAAA CCTGACGGCA ATGAAGTTGA TGATTCAGTG	420
TGGAAATCTC CAACAAATCA TATTATTTAT ATATTAGAGG GAAGTGCTAT CGATGAAATA	480
AATTATAATG GAGAAAGGAT AGCTGACGAC ACTTTTCTAA TTATTTTGAA TGGAGCAAGT	540
ACTAATCTTA AGATAAAGT ACCTCATGGA AAATGGGAGT TAGTGTTACA TCCTTATCCA	600
CATGAGCCAT CTAACGATAA AAAGATAATA GAAAACAACA AAGAAGTAGA AATAGATGGA	660
AAGACTGCAC TAATTTACAG GAGGATAGAG TTCCAGTGAT ATCAGCAACC TACAGATTAC	720
AGTTAAATAA GAATTTTAAT TTTGGTGACC TAATCGATAA CCTATGGTAT TTTAAGGATT	780

— 225 —

TAGGAGTTTC CCATCTCTAC CTCTCTCCTG TCTTA ATG GCT TCG CCA GGA AGT AAC 836

Met Ala Ser Pro Gly Ser Asn

1

5

CAT GGG TAC GAT GTA ATA GAT CAT TCA AGG ATA AAC GAT GAA CTT GGA 884

His Gly Tyr Asp Val Ile Asp His Ser Arg Ile Asn Asp Glu Leu Gly

10

15

20

GGA GAG AAA GAA TAC AGG AGA TTA ATA GAG ACA GCT CAT ACT ATT GGA 932

Gly Glu Lys Glu Tyr Arg Arg Leu Ile Glu Thr Ala His Thr Ile Gly

25

30

35

TTA GGT ATT ATA CAG GAC ATA GTA CCA AAT CAC ATG GCT GTA AAT TCT 980

Leu Gly Ile Ile Gln Asp Ile Val Pro Asn His Met Ala Val Asn Ser

40

45

50

55

CTA AAT TGG CGA CTA ATG GAT GTA TTA AAA ATG GGT AAA AAG AGT AAA 1028

Leu Asn Trp Arg Leu Met Asp Val Leu Lys Met Gly Lys Lys Ser Lys

60

65

70

TAT TAT ACG TAC TTT GAC TTT TTC CCA GAA GAT GAT AAG ATA CGA TTA 1076

Tyr Tyr Thr Tyr Phe Asp Phe Phe Pro Glu Asp Asp Lys Ile Arg Leu

75

80

85

CCC ATA TTA GGA GAA GAT TTA GAT ACA GTG ATA AGT AAA GGT TTA TTA 1124

Pro Ile Leu Gly Glu Asp Leu Asp Thr Val Ile Ser Lys Gly Leu Leu

90

95

100

AAG ATA GTA AAA GAT GGA GAT GAA TAT TTC CTA GAA TAT TTC AAA TGG 1172

Lys Ile Val Lys Asp Gly Asp Glu Tyr Phe Leu Glu Tyr Phe Lys Trp

105

110

115

AAA CTT CCT CTA ACA GAG GTT GGA AAT GAT ATA TAC GAC ACT TTA CAA 1220

Lys Leu Pro Leu Thr Glu Val Gly Asn Asp Ile Tyr Asp Thr Leu Gln

120 125 130 135

AAA CAG AAT TAT ACC CTA ATG TCT TGG AAA AAT CCT CCT AGC TAT AGA 1268

Lys Gln Asn Tyr Thr Leu Met Ser Trp Lys Asn Pro Pro Ser Tyr Arg

140 145 150

CGA TTC TTC GAT GTT AAT ACT TTA ATA GGA GTA AAT GTC GAA AAA GAT 1316

Arg Phe Phe Asp Val Asn Thr Leu Ile Gly Val Asn Val Glu Lys Asp

155 160 165

CAC GTA TTT CAA GAG TCC CAT TCA AAG ATC TTA GAT TTA GAT GTT GAT 1364

His Val Phe Gln Glu Ser His Ser Lys Ile Leu Asp Leu Asp Val Asp

170 175 180

GGC TAT AGA ATT GAT CAT ATT GAT GGA TTA TAT GAT CCT GAG AAA TAT 1412

Gly Tyr Arg Ile Asp His Ile Asp Gly Leu Tyr Asp Pro Glu Lys Tyr

185 190 195

ATT AAT GAC CTG AGG TCA ATA ATT AAA AAT AAA ATA ATT ATT GTA GAA 1460

Ile Asn Asp Leu Arg Ser Ile Ile Lys Asn Lys Ile Ile Ile Val Glu

200 205 210 215

AAA ATT CTG GGA TTT CAG GAG GAA TTA AAA TTA AAT TCA GAT GGA ACT 1508

Lys Ile Leu Gly Phe Gln Glu Glu Leu Lys Leu Asn Ser Asp Gly Thr

220 225 230

ACA GGA TAT GAC TTC TTA AAT TAC TCC AAC TTA CTG TTT AAT TTT AAT 1556

Thr Gly Tyr Asp Phe Leu Asn Tyr Ser Asn Leu Leu Phe Asn Phe Asn

235

— 227 —

CAA GAG ATA ATG GAC AGT ATA TAT GAG AAT TTC ACA GCG GAG AAA ATA	1604
Gln Glu Ile Met Asp Ser Ile Tyr Glu Asn Phe Thr Ala Glu Lys Ile	
250 255 260	
TCT ATA AGT GAA AGT ATA AAG AAA ATA AAA GCG CAA ATA ATT GAT GAG	1652
Ser Ile Ser Glu Ser Ile Lys Lys Ile Lys Ala Gln Ile Ile Asp Glu	
265 270 275	
CTA TTT AGT TAT GAA GTT AAA AGA TTA GCA TCA CAA CTA GGA ATT AGC	1700
Leu Phe Ser Tyr Glu Val Lys Arg Leu Ala Ser Gln Leu Gly Ile Ser	
280 285 290 295	
TAC GAT ATA TTG AGA GAT TAC CTT TCT TGT ATA GAT GTG TAC AGA ACT	1748
Tyr Asp Ile Leu Arg Asp Tyr Leu Ser Cys Ile Asp Val Tyr Arg Thr	
300 305 310	
TAT GCT AAT CAG ATT GTA AAA GAG TGT GAT AAG ACC AAT GAG ATA GAG	1796
Tyr Ala Asn Gln Ile Val Lys Glu Cys Asp Lys Thr Asn Glu Ile Glu	
315 320 325	
GAA GCA ACC AAA AGA AAT CCA GAG GCT TAT ACT AAA TTA CAA CAA TAT	1844
Glu Ala Thr Lys Arg Asn Pro Glu Ala Tyr Thr Lys Leu Gln Gln Tyr	
330 335 340	
ATG CCA GCA GTA TAC GCT AAA GCT TAT GAA GAT ACT TTC CTC TTT AGA	1892
Met Pro Ala Val Tyr Ala Lys Ala Tyr Glu Asp Thr Phe Leu Phe Arg	
345 350 355	
TAC AAT AGA TTA ATA TCC ATA AAT GAG GTT GGA AGC GAT TTA CGA TAT	1940
Tyr Asn Arg Leu Ile Ser Ile Asn Glu Val Gly Ser Asp Leu Arg Tyr	
360 365 370 375	

TAT AAG ATA TCG CCT GAT CAG TTT CAT GTA TTT AAT CAA AAA CGA AGA	1988
Tyr Lys Ile Ser Pro Asp Gln Phe His Val Phe Asn Gln Lys Arg Arg	
380 385 390	
GGA AAA ATC ACA CTA AAT GCC ACT AGC ACA CAT GAT ACT AAG TTT AGT	2036
Gly Lys Ile Thr Leu Asn Ala Thr Ser Thr His Asp Thr Lys Phe Ser	
395 400 405	
GAA GAT GTA AGG ATG AAA ATA AGT GTA TTA AGT GAA TTT CCT GAA GAA	2084
Glu Asp Val Arg Met Lys Ile Ser Val Leu Ser Glu Phe Pro Glu Glu	
410 415 420	
TGG AAA AAT AAG GTC GAG GAA TGG CAT AGT ATC ATA AAT CCA AAG GTA	2132
Trp Lys Asn Lys <u>Val Glu Glu Trp His Ser Ile Ile Asn Pro Lys</u> Val	
425 430 435	
TCA AGA AAT GAT GAA TAT AGA TAT TAT CAG GTT TTA GTG GGA AGT TTT	2180
Ser Arg Asn Asp Glu Tyr Arg Tyr Tyr Gln Val Leu Val Gly Ser Phe	
440 445 450 455	
TAT GAG GGA TTC TCT AAT GAT TTT AAG GAG AGA ATA AAG CAA CAT ATG	2228
Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Asp Phe Lys Glu Arg Ile Lys Gln His Met	
460 465 470	
ATA AAA AGT GTC AGA GAA GCT AAG ATA AAT ACC TCA TGG AGA AAT CAA	2276
Ile Lys Ser Val Arg Glu Ala Lys Ile Asn Thr Ser Trp Arg Asn Gln	
475 480 485	
AAT AAA GAA TAT GAA AAT AGA GTA ATG GAA TTA GTG GAA GAA ACT TTT	2324
Asn Lys Glu Tyr Glu Asn Arg Val Met Glu Leu Val Glu Glu Thr Phe	
490 495 500	

— 229 —

ACC AAT AAG GAT TTC ATT AAA AGT TTC ATG AAA TTT GAA AGT AAG ATA 2372

Thr Asn Lys Asp Phe Ile Lys Ser Phe Met Lys Phe Glu Ser Lys Ile

505

510

515

AGA AGG ATA GGG ATG ATT AAG AGC TTA TCC TTG GTC GCA TTA AAA ATT 2420

Arg Arg Ile Gly Met Ile Lys Ser Leu Ser Leu Val Ala Leu Lys Ile

520

525

530

535

ATG TCA GCC GGT ATA CCT GAT TTT TAT CAG GGA ACA GAA ATA TGG CGA 2468

Met Ser Ala Gly Ile Pro Asp Phe Tyr Gln Gly Thr Glu Ile Trp Arg

540

545

550

TAT TTA CTT ACA GAT CCA GAT AAC AGA GTC CCA GTG GAT TTT AAG AAA 2516

Tyr Leu Leu Thr Asp Pro Asp Asn Arg Val Pro Val Asp Phe Lys Lys

555

560

565

TTA CAC GAA ATA TTA GAA AAA TCC AAA AAA TTT GAA AAA AAT ATG TTA 2564

Leu His Glu Ile Leu Glu Lys Ser Lys Lys Phe Glu Lys Asn Met Leu

570

575

580

GAG TCT ATG GAC GAT GGA AGA ATT AAG ATG TAT TTA ACA TAT AAG CTT 2612

Glu Ser Met Asp Asp Gly Arg Ile Lys Met Tyr Leu Thr Tyr Lys Leu

585

590

595

TTA TCC CTA AGA AAA CAG TTG GCT GAG GAT TTT TTA AAG GGC GAG TAT 2660

Leu Ser Leu Arg Lys Gln Leu Ala Glu Asp Phe Leu Lys Gly Glu Tyr

600

605

610

615

AAG GGA TTA GAT CTA GAA GAA GGA CTA TGT GGG TTT ATT AGG TTT AAC 2708

Lys Gly Leu Asp Leu Glu Glu Gly Leu Cys Gly Phe Ile Arg Phe Asn

620

625

630

— 230 —

AAA ATT TTG GTA ATA ATA AAA ACC AAG GGA AGT GTT AAT TAC AAA CTG	2756
Lys Ile Leu Val Ile Ile Lys Thr Lys Gly Ser Val Asn Tyr Lys Leu	
635 640 645	
AAA CTT GAA GAG GGA GCA ATT TAC ACA GAT GTA TTG ACA GGA GAA GAA	2804
Lys Leu Glu Glu Gly Ala Ile Tyr Thr Asp Val Leu Thr Gly Glu Glu	
650 655 660	
ATT AAA AAA GAG GTA CAG ATT AAT GAG CTA CCT AGG ATA CTA GTT AGA	2852
Ile Lys Lys Glu Val Gln Ile Asn Glu Leu Pro Arg Ile Leu Val Arg	
665 670 675	
ATG TAAGTTATAA TAATCCGATT TTTATGTGAC AAGATTTACG CTTACGAAAA	2905
Met	
680	
GGACTGTAA ATCAACTTTT ATGTGAATTA TGAAACGTAA ATTATAAGTT TCCTGAGGAT	2965
AAACATATAT ATCTCTATCT CTCATTGATA TCACATGAGT ATTAGATTAA GGGGAAGTAA	3025
TTCTTACGGA CATTGAGGCT GGTTCACAGT ATACTGTAGA ATATGTAATA GGAAAATAAG	3085
AATAGGAACG GACTTAGTCT ACAAATGCCC TAAATGTGAA AAGAAGTATA ACGCATTCTT	3145
CTGTGAAGCA GATGCTAGGG GATTAAAGAA AAAGTGCCCA TACTGTGGTA CTGAACTTGT	3205
CAGTGCAATT TAAGACTCAA ATAGAAGGTA AAAATATTTT TATACTGAAT AATGAGTTGT	3265
TTTACGCTGA TACGGATATA GTTATTCGAA ATCAAGATTT TATTAAGAAA CTCACCTTTA	3325
CACAATATAA TAAGATTGCC TATATTGACA TGGACATAGA AACGACAGAA TTAAAGATAT	3385
TAAGATTAGT AGTGTGTAAA ACTAGAATAA ATATTTATGT TTGCAACGTA ATTGGTAAAT	3445
TGAAAGAAAC TAATTTTGAA AA	3467

— 231 —

配列番号 : 4

配列の長さ : 680

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物 : *Sulfolobus acidocaldarius*

株名 : ATCC 33909株

配列

Met Ala Ser Pro Gly Ser Asn His Gly Tyr Asp Val Ile Asp His Ser

1 5 10 15

Arg Ile Asn Asp Glu Leu Gly Gly Glu Lys Glu Tyr Arg Arg Leu Ile

20 25 30

Glu Thr Ala His Thr Ile Gly Leu Gly Ile Ile Gln Asp Ile Val Pro

35 40 45

Asn His Met Ala Val Asn Ser Leu Asn Trp Arg Leu Met Asp Val Leu

50 55 60

Lys Met Gly Lys Lys Ser Lys Tyr Tyr Thr Tyr Phe Asp Phe Phe Pro

65 70 75 80

Glu Asp Asp Lys Ile Arg Leu Pro Ile Leu Gly Glu Asp Leu Asp Thr

85 90 95

Val Ile Ser Lys Gly Leu Leu Lys Ile Val Lys Asp Gly Asp Glu Tyr

100 105 110

— 232 —

Phe Leu Glu Tyr Phe Lys Trp Lys Leu Pro Leu Thr Glu Val Gly Asn

115

120

125

Asp Ile Tyr Asp Thr Leu Gln Lys Gln Asn Tyr Thr Leu Met Ser Trp

130

135

140

Lys Asn Pro Pro Ser Tyr Arg Arg Phe Phe Asp Val Asn Thr Leu Ile

145

150

155

160

Gly Val Asn Val Glu Lys Asp His Val Phe Gln Glu Ser His Ser Lys

165

170

175

Ile Leu Asp Leu Asp Val Asp Gly Tyr Arg Ile Asp His Ile Asp Gly

180

185

190

Leu Tyr Asp Pro Glu Lys Tyr Ile Asn Asp Leu Arg Ser Ile Ile Lys

195

200

205

Asn Lys Ile Ile Ile Val Glu Lys Ile Leu Gly Phe Gln Glu Glu Leu

210

215

220

Lys Leu Asn Ser Asp Gly Thr Thr Gly Tyr Asp Phe Leu Asn Tyr Ser

225

230

235

240

Asn Leu Leu Phe Asn Phe Asn Gln Glu Ile Met Asp Ser Ile Tyr Glu

245

250

255

Asn Phe Thr Ala Glu Lys Ile Ser Ile Ser Glu Ser Ile Lys Lys Ile

260

265

270

Lys Ala Gln Ile Ile Asp Glu Leu Phe Ser Tyr Glu Val Lys Arg Leu

275

280

285

Ala Ser Gln Leu Gly Ile Ser Tyr Asp Ile Leu Arg Asp Tyr Leu Ser

290

295

300

— 233 —

Cys Ile Asp Val Tyr Arg Thr Tyr Ala Asn Gln Ile Val Lys Glu Cys

305 310 315 320

Asp Lys Thr Asn Glu Ile Glu Glu Ala Thr Lys Arg Asn Pro Glu Ala

325 330 335

Tyr Thr Lys Leu Gln Gln Tyr Met Pro Ala Val Tyr Ala Lys Ala Tyr

340 345 350

Glu Asp Thr Phe Leu Phe Arg Tyr Asn Arg Leu Ile Ser Ile Asn Glu

355 360 365

Val Gly Ser Asp Leu Arg Tyr Tyr Lys Ile Ser Pro Asp Gln Phe His

370 375 380

Val Phe Asn Gln Lys Arg Arg Gly Lys Ile Thr Leu Asn Ala Thr Ser

385 390 395 400

Thr His Asp Thr Lys Phe Ser Glu Asp Val Arg Met Lys Ile Ser Val

405 410 415

Leu Ser Glu Phe Pro Glu Glu Trp Lys Asn Lys Val Glu Glu Trp His

420 425 430

Ser Ile Ile Asn Pro Lys Val Ser Arg Asn Asp Glu Tyr Arg Tyr Tyr

435 440 445

Gln Val Leu Val Gly Ser Phe Tyr Glu Gly Phe Ser Asn Asp Phe Lys

450 455 460

Glu Arg Ile Lys Gln His Met Ile Lys Ser Val Arg Glu Ala Lys Ile

465 470 475 480

Asn Thr Ser Trp Arg Asn Gln Asn Lys Glu Tyr Glu Asn Arg Val Met

485 490 495

— 234 —

Glu Leu Val Glu Glu Thr Phe Thr Asn Lys Asp Phe Ile Lys Ser Phe

500

505

510

Met Lys Phe Glu Ser Lys Ile Arg Arg Ile Gly Met Ile Lys Ser Leu

515

520

525

Ser Leu Val Ala Leu Lys Ile Met Ser Ala Gly Ile Pro Asp Phe Tyr

530

535

540

Gln Gly Thr Glu Ile Trp Arg Tyr Leu Leu Thr Asp Pro Asp Asn Arg

545

550

555

560

Val Pro Val Asp Phe Lys Lys Leu His Glu Ile Leu Glu Lys Ser Lys

565

570

575

Lys Phe Glu Lys Asn Met Leu Glu Ser Met Asp Asp Gly Arg Ile Lys

580

585

590

Met Tyr Leu Thr Tyr Lys Leu Leu Ser Leu Arg Lys Gln Leu Ala Glu

595

600

605

Asp Phe Leu Lys Gly Glu Tyr Lys Gly Leu Asp Leu Glu Glu Gly Leu

610

615

620

Cys Gly Phe Ile Arg Phe Asn Lys Ile Leu Val Ile Ile Lys Thr Lys

625

630

635

640

Gly Ser Val Asn Tyr Lys Leu Lys Leu Glu Glu Gly Ala Ile Tyr Thr

645

650

655

Asp Val Leu Thr Gly Glu Glu Ile Lys Lys Glu Val Gln Ile Asn Glu

660

665

670

Leu Pro Arg Ile Leu Val Arg Met

675

680

— 235 —

配列番号 : 5

配列の長さ : 2691

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物 : *Sulfolobus solfataricus*

株名 : KM1

配列

```
CTGCAGTAAC TAGCGCTATC GAAGACGTTA TAAAGAGAAG GATAAATAGA GTTCCAGTGA 60
GTCTAGAAGA CCTTTTGGAA TAAGGACTTT AATATCATTT AAATTTATTT TTTGGAACAT 120
GCAGAGGTAA ACCCATGAAT GTCATTTTCG ACGTATTAAA CGAGATCCAT GGGTTTTTTG 180
GTGCATTGTG GGC GGGAGCA GCTCTACTTA ACTACTTAGT TAAGCCTCAA GATAAGAGGC 240
AATTTGAGAG AATAGGGAAA TTCTTCATGA TAACTCAGT CATTACAGTA ATAAGTGGGA 300
TAATAATTTT CGCTACATT TACCTAGCCC CTTATCAAGG GAATTTATTT CTAGTAGCGG 360
CAATTCTACG TTCAAGCCTT GACATTAGGT TAAGGGCCTT ACTAACTTA ATAGGAGGAG 420
CGTTTGGGTT ATTGGCTTTT GGGGCAGGGA TAGTTATAAG CAATAGGATA AGGCTTATGG 480
TACGTGTTAA GGAAGGTGAC GCTACAATCC TAGAGTTGAG GAATAGTATT GCCAATTTAT 540
CTAAAATTAG TTAAATCTTC TTATTACTTT CCTTAGCCAT GATGATACTT GCTGGTTCCA 600
TAGCACAAGT TATAAGTTAG AGTTGAAAGA AAAATTTA ATG ACG TTT GCT TAT AAA 656
```

Met Thr Phe Ala Tyr Lys

0 1

5

— 236 —

ATA GAT GGA AAT GAG GTA ATC TTT ACC TTA TGG GCA CCT TAT CAA AAG	704
Ile Asp Gly Asn Glu Val Ile Phe Thr Leu Trp Ala Pro Tyr Gln Lys	
10 15 20	
AGC GTT AAA CTA AAG GTT CTA GAG AAG GGA CTT TAC GAA ATG GAA AGA	752
Ser Val Lys Leu Lys Val Leu Glu Lys Gly Leu Tyr Glu Met Glu Arg	
25 30 35	
GAT GAA AAA GGT TAC TTC ACC ATT ACC TTA AAC AAC GTA AAG GTT AGA	800
Asp Glu Lys Gly Tyr Phe Thr Ile Thr Leu Asn Asn Val Lys Val Arg	
40 45 50	
GAT AGG TAT AAA TAC GTT TTA GAT GAT GCT AGT GAA ATA CCA GAT CCA	848
Asp Arg Tyr Lys Tyr Val Leu Asp Asp Ala Ser Glu Ile Pro Asp Pro	
55 60 65	
GCA TCC AGA TAC CAA CCA GAA GGT GTA CAT GGG CCT TCA CAA ATT ATA	896
Ala Ser Arg Tyr Gln Pro Glu Gly Val His Gly Pro Ser Gln Ile Ile	
70 75 80 85	
CAA GAA AGT AAA GAG TTC AAC AAC GAG ACT TTT CTG AAG AAA GAG GAC	944
Gln Glu Ser Lys Glu Phe Asn Asn Glu Thr Phe Leu Lys Lys Glu Asp	
90 95 100	
TTG ATA ATT TAT GAA ATA CAC GTG GGG ACT TTC ACT CCA GAG GGA ACG	992
Leu Ile Ile Tyr Glu Ile His Val Gly Thr Phe Thr Pro Glu Gly Thr	
105 110 115	
TTT GAG GGA GTG ATA AGG AAA CTT GAC TAC TTA AAG GAT TTG GGA ATT	1040
Phe Glu Gly Val Ile Arg Lys Leu Asp Tyr Leu Lys Asp Leu Gly Ile	
120 125 130	

— 237 —

ACG GCA ATA GAG ATA ATG CCA ATA GCT CAA TTT CCT GGG AAA AGG GAT 1088

Thr Ala Ile Glu Ile Met Pro Ile Ala Gln Phe Pro Gly Lys Arg Asp

135

140

145

TGG GGT TAT GAT GGA GTT TAT TTA TAT GCA GTA CAG AAC TCT TAC GGA 1136

Trp Gly Tyr Asp Gly Val Tyr Leu Tyr Ala Val Gln Asn Ser Tyr Gly

150

155

160

165

GGG CCA GAA GGT TTT AGA AAG TTA GTT GAT GAA GCG CAC AAG AAA GGT 1184

Gly Pro Glu Gly Phe Arg Lys Leu Val Asp Glu Ala His Lys Lys Gly

170

175

180

TTA GGA GTT ATT TTA GAC GTA GTA TAC AAC CAC GTT GGA CCA GAG GGA 1232

Leu Gly Val Ile Leu Asp Val Val Tyr Asn His Val Gly Pro Glu Gly

185

190

195

AAC TAT ATG GTT AAA TTG GGG CCA TAT TTC TCA CAG AAA TAC AAA ACG 1280

Asn Tyr Met Val Lys Leu Gly Pro Tyr Phe Ser Gln Lys Tyr Lys Thr

200

205

210

CCA TGG GGA TTA ACC TTT AAC TTT GAC GAT GCT GAA AGC GAT GAG GTT 1328

Pro Trp Gly Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asp Ala Glu Ser Asp Glu Val

215

220

225

AGG AAG TTC ATC TTA GAA AAC GTT GAG TAC TGG ATT AAG GAA TAT AAC 1376

Arg Lys Phe Ile Leu Glu Asn Val Glu Tyr Trp Ile Lys Glu Tyr Asn

230

235

240

245

GTT GAT GGG TTT AGA TTA GAT GCG GTT CAT GCA ATT ATT GAC ACT TCT 1424

Val Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val His Ala Ile Ile Asp Thr Ser

250

255

260

— 238 —

CCT AAG CAC ATC TTG GAG GAA ATA GCT GAC GTT GTG CAT AAG TAT AAT 1472

Pro Lys His Ile Leu Glu Glu Ile Ala Asp Val Val His Lys Tyr Asn

265

270

275

AGG ATT GTC ATA GCC GAA AGT GAT TTA AAC GAT CCT AGA GTC GTT AAT 1520

Arg Ile Val Ile Ala Glu Ser Asp Leu Asn Asp Pro Arg Val Val Asn

280

285

290

CCC AAG GAA AAG TGT GGA TAT AAT ATT GAT GCT CAA TGG GTT GAC GAT 1568

Pro Lys Glu Lys Cys Gly Tyr Asn Ile Asp Ala Gln Trp Val Asp Asp

295

300

305

TTC CAT CAT TCT ATT CAC GCT TAC TTA ACT GGT GAG AGG CAA GGC TAT 1616

Phe His His Ser Ile His Ala Tyr Leu Thr Gly Glu Arg Gln Gly Tyr

310

315

320

325

TAT ACG GAT TTC GGT AAC CTT GAC GAT ATA GTT AAA TCG TAT AAG GAC 1664

Tyr Thr Asp Phe Gly Asn Leu Asp Asp Ile Val Lys Ser Tyr Lys Asp

330

335

340

GTT TTC GTA TAT GAT GGT AAG TAC TCC AAT TTT AGA AGA AAA ACT CAC 1712

Val Phe Val Tyr Asp Gly Lys Tyr Ser Asn Phe Arg Arg Lys Thr His

345

350

355

GGA GAA CCA GTT GGT GAA CTA GAC GGA TGC AAT TTC GTA GTT TAT ATA 1760

Gly Glu Pro Val Gly Glu Leu Asp Gly Cys Asn Phe Val Val Tyr Ile

360

365

370

CAA AAT CAC GAT CAA GTC GGA AAT AGA GGC AAA GGT GAA AGA ATA ATT 1808

Gln Asn His Asp Gln Val Gly Asn Arg Gly Lys Gly Glu Arg Ile Ile

375

380

385

- 239 -

AAA TTA GTC GAT AGG GAA AGC TAC AAG ATC GCT GCA GCC CTT TAC CTT	1856
Lys Leu Val Asp Arg Glu Ser Tyr Lys Ile Ala Ala Ala Leu Tyr Leu	
390 395 400 405	
CTT TCC CCC TAT ATT CCA ATG ATT TTC ATG GGA GAG GAA TAC GGT GAG	1904
Leu Ser Pro Tyr Ile Pro Met Ile Phe Met Gly Glu Glu Tyr Gly Glu	
410 415 420	
GAA AAT CCC TTT TAT TTC TTT TCT GAT TTT TCA GAT TCA AAA CTG ATA	1952
Glu Asn Pro Phe Tyr Phe Phe Ser Asp Phe Ser Asp Ser Lys Leu Ile	
425 430 435	
CAA GGT GTA AGG GAA GGG AGA AAA AAG GAA AAC GGG CAA GAT ACT GAC	2000
Gln Gly Val Arg Glu Gly Arg Lys Lys Glu Asn Gly Gln Asp Thr Asp	
440 445 450	
CCT CAA GAT GAA TCA ACT TTT AAC GCT TCC AAA CTG AGT TGG AAG ATT	2048
Pro Gln Asp Glu Ser Thr Phe Asn Ala Ser Lys Leu Ser Trp Lys Ile	
455 460 465	
GAC GAG GAA ATC TTT TCA TTT TAC AAG ATT TTA ATA AAA ATG AGA AAG	2096
Asp Glu Glu Ile Phe Ser Phe Tyr Lys Ile Leu Ile Lys Met Arg Lys	
470 475 480 485	
GAG TTG AGC ATA GCG TGT GAT AGG AGA GTA AAC GTC GTG AAT GGC GAA	2144
Glu Leu Ser Ile Ala Cys Asp Arg Arg Val Asn Val Val Asn Gly Glu	
490 495 500	
AAT TGG TTG ATC ATC AAG GGA AGA GAA TAC TTT TCA CTC TAC GTT TTC	2192
Asn Trp Leu Ile Ile Lys Gly Arg Glu Tyr Phe Ser Leu Tyr Val Phe	
505 510 515	

— 240 —

TCT AAA TCA TCT ATT GAA GTT AAG TAC AGT GGA ACT TTA CTT TTG TCC 2240
Ser Lys Ser Ser Ile Glu Val Lys Tyr Ser Gly Thr Leu Leu Leu Ser
520 525 530
TCA AAT AAT TCA TTC CCT CAG CAT ATT GAA GAA GGT AAA TAT GAG TTT 2288
Ser Asn Asn Ser Phe Pro Gln His Ile Glu Glu Gly Lys Tyr Glu Phe
535 540 545
GAT AAG GGA TTT GCT TTA TAT AAA CTT TAGGACA GGAGAGTTTA AAAATTTCTA 2342
Asp Lys Gly Phe Ala Leu Tyr Lys Leu
550 555
TGAATGATTA TACTTTAGAT GATGAGTAAA AGCAAGATCG ATGAGGAAGA GAAAAGGAGA 2402
AGAGAAGAAG TCAAAAAGTT AGTAATGCTC TTAGCAATGT TAAGATAATG TTTTTTTAAA 2462
CTCAAATAAT AATAAATACC ATCATGTCAA TATTCTTCAG AACTAGAGAT AGACCTTTAC 2522
GTCCCGGAGA TCCGTATCCA TTAGGTTCAA ATTGGATAGA AGATGAGGAT GCGGTAAATT 2582
TTTCCTTGTT CTCAGAGAAT GCAGACAAAG TGGAGTTGAT TCTTTATTCA CAAACAAATC 2642
AAAAGTATCC AAAGGAGATA ATAGAGGTGA AGAATAGAAC GGGGGATCC 2691

配列番号 : 6

配列の長さ : 558

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源

生物 : *Sulfolobus solfataricus*

株名: KM1

配列

Thr Phe Ala Tyr Lys Ile Asp Gly Asn Glu Val Ile Phe Thr Leu Trp

1 5 10 15

Ala Pro Tyr Gln Lys Ser Val Lys Leu Lys Val Leu Glu Lys Gly Leu

20 25 30

Tyr Glu Met Glu Arg Asp Glu Lys Gly Tyr Phe Thr Ile Thr Leu Asn

35 40 45

Asn Val Lys Val Arg Asp Arg Tyr Lys Tyr Val Leu Asp Asp Ala Ser

50 55 60

Glu Ile Pro Asp Pro Ala Ser Arg Tyr Gln Pro Glu Gly Val His Gly

65 70 75 80

Pro Ser Gln Ile Ile Gln Glu Ser Lys Glu Phe Asn Asn Glu Thr Phe

85 90 95

Leu Lys Lys Glu Asp Leu Ile Ile Tyr Glu Ile His Val Gly Thr Phe

100 105 110

Thr Pro Glu Gly Thr Phe Glu Gly Val Ile Arg Lys Leu Asp Tyr Leu

115 120 125

Lys Asp Leu Gly Ile Thr Ala Ile Glu Ile Met Pro Ile Ala Gln Phe

130 135 140

Pro Gly Lys Arg Asp Trp Gly Tyr Asp Gly Val Tyr Leu Tyr Ala Val

145 150 155 160

Gln Asn Ser Tyr Gly Gly Pro Glu Gly Phe Arg Lys Leu Val Asp Glu

165 170 175

— 242 —

Ala His Lys Lys Gly Leu Gly Val Ile Leu Asp Val Val Tyr Asn His

180

185

190

Val Gly Pro Glu Gly Asn Tyr Met Val Lys Leu Gly Pro Tyr Phe Ser

195

200

205

Gln Lys Tyr Lys Thr Pro Trp Gly Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asp Ala

210

215

220

Glu Ser Asp Glu Val Arg Lys Phe Ile Leu Glu Asn Val Glu Tyr Trp

225

230

235

240

Ile Lys Glu Tyr Asn Val Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val His Ala

245

250

255

Ile Ile Asp Thr Ser Pro Lys His Ile Leu Glu Glu Ile Ala Asp Val

260

265

270

Val His Lys Tyr Asn Arg Ile Val Ile Ala Glu Ser Asp Leu Asn Asp

275

280

285

Pro Arg Val Val Asn Pro Lys Glu Lys Cys Gly Tyr Asn Ile Asp Ala

290

295

300

Gln Trp Val Asp Asp Phe His His Ser Ile His Ala Tyr Leu Thr Gly

305

310

315

320

Glu Arg Gln Gly Tyr Tyr Thr Asp Phe Gly Asn Leu Asp Asp Ile Val

325

330

335

Lys Ser Tyr Lys Asp Val Phe Val Tyr Asp Gly Lys Tyr Ser Asn Phe

340

345

350

Arg Arg Lys Thr His Gly Glu Pro Val Gly Glu Leu Asp Gly Cys Asn

355

360

365

— 243 —

Phe Val Val Tyr Ile Gln Asn His Asp Gln Val Gly Asn Arg Gly Lys

370

375

380

Gly Glu Arg Ile Ile Lys Leu Val Asp Arg Glu Ser Tyr Lys Ile Ala

385

390

395

400

Ala Ala Leu Tyr Leu Leu Ser Pro Tyr Ile Pro Met Ile Phe Met Gly

405

410

415

Glu Glu Tyr Gly Glu Glu Asn Pro Phe Tyr Phe Phe Ser Asp Phe Ser

420

425

430

Asp Ser Lys Leu Ile Gln Gly Val Arg Glu Gly Arg Lys Lys Glu Asn

435

440

445

Gly Gln Asp Thr Asp Pro Gln Asp Glu Ser Thr Phe Asn Ala Ser Lys

450

455

460

Leu Ser Trp Lys Ile Asp Glu Glu Ile Phe Ser Phe Tyr Lys Ile Leu

465

470

475

480

Ile Lys Met Arg Lys Glu Leu Ser Ile Ala Cys Asp Arg Arg Val Asn

485

490

495

Val Val Asn Gly Glu Asn Trp Leu Ile Ile Lys Gly Arg Glu Tyr Phe

500

505

510

Ser Leu Tyr Val Phe Ser Lys Ser Ser Ile Glu Val Lys Tyr Ser Gly

515

520

525

Thr Leu Leu Leu Ser Ser Asn Asn Ser Phe Pro Gln His Ile Glu Glu

530

535

540

Gly Lys Tyr Glu Phe Asp Lys Gly Phe Ala Leu Tyr Lys Leu

545

550

555

配列番号 : 7

配列の長さ : 3600

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源 : *Sulfolobus acidocaldarius*

株名 : ATCC 33909

配列

ATTCGTTTTG AGTCACTCGG CGTAGGTCTG TAGTCTTTCT TGGCGAGGGC TAATAAGTTG	60
AGATAATGCT TGCCAAGAAT CGAAGAAGGC GTCCTGCCCT GCATGAAATC GATTACCTCG	120
GCACTAACTC CGAGCTCCGC GAGTTTAGTA GTCACGAATT TGGGTACATA TTTCGGCGCT	180
ATCCCTTTCT CATGCAATAA ATTCTTCGCG TAGTTGTACG TTATATCAGT CTTAGCTATA	240
GACGAAATGT GAAAGACATA GAACACTTTC TTTGGCCCTC TAGTCCAGTT GAGCGTGTAT	300
ACGTAGAAGC CGTCCTCTTT CACGTTGTTT TTCTCGTCAT ACTCATTGAG AACCTTTACA	360
GCCTCCCTAA GCCTTATACC GCTCTCAAGG AGGAGCTTGA AGACTAGCTC TACCTCAATA	420
CCTCTAACAG CCTCCAACCA CCTCCCTATC TCGTCAGCTC CTGGAACCTT AAGATCAACA	480
CCAGACTTTT TCGTTTTTCT CTTTTTCCAT GCCTCAAGAT CCCCTTTCCA CTTGTAGAAC	540
TTCTTCCAGG CTAGGATAGA GTTCTTAGCA TTAGTAGGGG GCTTCTTCAG ATAATTGATA	600
TACTGCCTGC AAGTTTCCTC ACTGGCCATT TTCAAACAAT ATTCATAAAA TTCAATTAAT	660
TCCTTTTCCG TGAGACCATT TTTGCCCTCC CTAGAAGTAA GGGAGTTTAG GGCAAATCCC	720
TTACTCTCTT CATCATTTGA AAGAGGGGTT TTAGGGGATT CCTCCCCTAA CCAGGGGCTTT	780
GGCCCCCTGGG ACCAGGGTTC GAGTCCCTGC CCGGCTACCT TTGAAAGGTT AGGGGGATAC	840
ACCCTAATAC CCCACTTCTA TCTTACAATT TCAGGTAAGT CTTTACTAGG TCAACTAAAG	900

— 245 —

CACCAACGTA AGTCTCCTTC GTCTTACCAC CTTGACTCTT CTTGATAAAG TAAACATAAT 960
 ATCATCCATA GACTTACCTT ATTCTTATAT TACCATATGA TTTTATTATT TTGTATTTCT 1020
 ATTAGATAAG TCCCACATCAT AGAACAAATG ATGGTTTTAA CTTATATACT AAATACTCTA 1080
 ATAACTCAAC AATAATAAGA ATTTAATCAG TTCTGATAAG TATTTTCACT CGAAAACATT 1140
 TAAATATATT AAGACATAAT TTCTATTTAA ACAGC ATG TTT TCG TTC GGT GGA AAT 1196

Met Phe Ser Phe Gly Gly Asn

1

5

ATT GAA AAA AAT AAA GGT ATC TTT AAG TTA TGG GCA CCT TAT GTT AAT 1244
 Ile Glu Lys Asn Lys Gly Ile Phe Lys Leu Trp Ala Pro Tyr Val Asn

10

15

20

AGT GTT AAG CTG AAG TTA AGC AAA AAA CTT ATT CCA ATG GAA AAA AAC 1292
 Ser Val Lys Leu Lys Leu Ser Lys Lys Leu Ile Pro Met Glu Lys Asn

25

30

35

GAT GAG GGA TTT TTC GAA GTA GAA ATA GAC GAT ATC GAG GAA AAT TTA 1340
 Asp Glu Gly Phe Phe Glu Val Glu Ile Asp Asp Ile Glu Glu Asn Leu

40

45

50

55

ACC TAT TCT TAT ATT ATA GAA GAT AAG AGA GAG ATA CCT GAT CCC GCA 1388
 Thr Tyr Ser Tyr Ile Ile Glu Asp Lys Arg Glu Ile Pro Asp Pro Ala

60

65

70

TCA CGA TAT CAA CCT TTA GGA GTT CAT GAC AAA TCA CAA CTT ATA AGA 1436
 Ser Arg Tyr Gln Pro Leu Gly Val His Asp Lys Ser Gln Leu Ile Arg

75

80

85

— 246 —

ACA GAT TAT CAG ATT CTT GAC CTT GGA AAA GTA AAA ATA GAA GAT CTA	1484
Thr Asp Tyr Gln Ile Leu Asp Leu Gly Lys Val Lys Ile Glu Asp Leu	
90 95 100	
ATA ATA TAT GAA CTC CAC GTT GGT ACT TTT TCC CAA GAA GGA AAT TTC	1532
Ile Ile Tyr Glu Leu His Val Gly Thr Phe Ser Gln Glu Gly Asn Phe	
105 110 115	
AAA GGA GTA ATA GAA AAG TTA GAT TAC CTC AAG GAT CTA GGA ATC ACA	1580
Lys Gly Val Ile Glu Lys Leu Asp Tyr Leu Lys Asp Leu Gly Ile Thr	
120 125 130 135	
GGA ATT GAA CTG ATG CCT GTG GCA CAA TTT CCA GGG AAT AGA GAT TGG	1628
Gly Ile Glu Leu Met Pro Val Ala Gln Phe Pro Gly Asn Arg Asp Trp	
140 145 150	
GGA TAC GAT GGT GTT TTT CTA TAC GCA GTT CAA AAT ACT TAT GGC GGA	1676
Gly Tyr Asp Gly Val Phe Leu Tyr Ala Val Gln Asn Thr Tyr Gly Gly	
155 160 165	
CCA TGG GAA TTG GCT AAG CTA GTA AAC GAG GCA CAT AAA AGG GGA ATA	1724
Pro Trp Glu Leu Ala Lys Leu Val Asn Glu Ala His Lys Arg Gly Ile	
170 175 180	
GCC GTA ATT TTG GAT GTT GTA TAT AAT CAT ATA GGT CCT GAG GGA AAT	1772
Ala Val Ile Leu Asp Val Val Tyr Asn His Ile Gly Pro Glu Gly Asn	
185 190 195	
TAC CTT TTA GGA TTA GGT CCT TAT TTT TCA GAC AGA TAT AAA ACT CCA	1820
Tyr Leu Leu Gly Leu Gly Pro Tyr Phe Ser Asp Arg Tyr Lys Thr Pro	
200 205 210 215	

— 247 —

TGG GGA TTA ACA TTT AAT TTT GAT GAT AGG GGA TGT GAT CAA GTT AGA	1868
Trp Gly Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asp Arg Gly Cys Asp Gln Val Arg	
220 225 230	
AAA TTC ATT TTA GAA AAT GTC GAG TAT TGG TTT AAG ACC TTT AAA ATC	1916
Lys Phe Ile Leu Glu Asn Val Glu Tyr Trp Phe Lys Thr Phe Lys Ile	
235 240 245	
GAT GGT CTG AGA CTG GAT GCA GTT CAT GCA ATT TTT GAT AAT TCG CCT	1964
Asp Gly Leu Arg Leu Asp Ala Val His Ala Ile Phe Asp Asn Ser Pro	
250 255 260	
AAG CAT ATC CTC CAA GAG ATA GCT GAA AAA GCC CAT CAA TTA GGA AAA	2012
Lys His Ile Leu Gln Glu Ile Ala Glu Lys Ala His Gln Leu Gly Lys	
265 270 275	
TTT GTT ATT GCT GAA AGT GAT TTA AAT GAT CCA AAA ATA GTA AAA GAT	2060
Phe Val Ile Ala Glu Ser Asp Leu Asn Asp Pro Lys Ile Val Lys Asp	
280 285 290 295	
GAT TGT GGA TAT AAA ATA GAT GCT CAA TGG GTT GAC GAT TTC CAC CAC	2108
Asp Cys Gly Tyr Lys Ile Asp Ala Gln Trp Val Asp Asp Phe His His	
300 305 310	
GCA GTT CAT GCA TTC ATA ACA AAA GAA AAA GAT TAT TAT TAC CAG GAT	2156
Ala Val His Ala Phe Ile Thr Lys Glu Lys Asp Tyr Tyr Tyr Gln Asp	
315 320 325	
TTT GGA AGG ATA GAA GAT ATA GAG AAA ACT TTT AAA GAT GTT TTT GTT	2204
Phe Gly Arg Ile Glu Asp Ile Glu Lys Thr Phe Lys Asp Val Phe Val	
330 335 340	

TAT GAT GGA AAG TAT TCT AGA TAC AGA GGA AGA ACT CAT GGT GCT CCT	2252
Tyr Asp Gly Lys Tyr Ser Arg Tyr Arg Gly Arg Thr His Gly Ala Pro	
345 350 355	
GTA GGT GAT CTT CCA CCA CGT AAA TTT GTA GTC TTC ATA CAA AAT CAC	2300
Val Gly Asp Leu Pro Pro Arg Lys Phe Val Val Phe Ile Gln Asn His	
360 365 370 375	
GAT CAA GTA GGA AAT AGA GGA AAT GGG GAA AGA CTT TCC ATA TTA ACC	2348
Asp Gln Val Gly Asn Arg Gly Asn Gly Glu Arg Leu Ser Ile Leu Thr	
380 385 390	
GAT AAA ACG ACA TAC CTT ATG GCA GCC ACA CTA TAT ATA CTC TCA CCG	2396
Asp Lys Thr Thr Tyr Leu Met Ala Ala Thr Leu Tyr Ile Leu Ser Pro	
395 400 405	
TAT ATA CCG CTA ATA TTT ATG GGC GAG GAA TAT TAT GAG ACG AAT CCT	2444
Tyr Ile Pro Leu Ile Phe Met Gly Glu Glu Tyr Tyr Glu Thr Asn Pro	
410 415 420	
TTT TTC TTC TTC TCT GAT TTC TCA GAT CCC GTA TTA ATT AAG GGT GTT	2492
Phe Phe Phe Phe Ser Asp Phe Ser Asp Pro Val Leu Ile Lys Gly Val	
425 430 435	
AGA GAA GGT AGA CTA AAG GAA AAT AAT CAA ATG ATA GAT CCA CAA TCT	2540
Arg Glu Gly Arg Leu Lys Glu Asn Asn Gln Met Ile Asp Pro Gln Ser	
440 445 450 455	
GAG GAA GCG TTC TTA AAG AGT AAA CTT TCA TGG AAA ATT GAT GAG GAA	2588
Glu Glu Ala Phe Leu Lys Ser Lys Leu Ser Trp Lys Ile Asp Glu Glu	
460 465 470	

— 249 —

GTT TTA GAT TAT TAT AAA CAA CTG ATA AAT ATC AGA AAG AGA TAT AAT	2636
Val Leu Asp Tyr Tyr Lys Gln Leu Ile Asn Ile Arg Lys Arg Tyr Asn	
475 480 485	
AAT TGT AAA AGG GTA AAG GAA GTT AGG AGA GAA GGG AAC TGT ATT ACT	2684
Asn Cys Lys Arg Val Lys Glu Val Arg Arg Glu Gly Asn Cys Ile Thr	
490 495 500	
TTG ATC ATG GAA AAA ATA GGA ATA ATT GCA TCG TTT GAT GAT ATT GTA	2732
Leu Ile Met Glu Lys Ile Gly Ile Ile Ala Ser Phe Asp Asp Ile Val	
505 510 515	
ATT AAT TCT AAA ATT ACA GGT AAT TTA CTT ATA GGC ATA GGA TTT CCG	2780
Ile Asn Ser Lys Ile Thr Gly Asn Leu Leu Ile Gly Ile Gly Phe Pro	
520 525 530 535	
AAA AAA TTG AAA AAA GAT GAA TTA ATT AAG GTT AAC AGA GGT GTT GGG	2828
Lys Lys Leu Lys Lys Asp Glu Leu Ile Lys Val Asn Arg Gly Val Gly	
540 545 550	
GTA TAT CAA TTA GAA TGAAAGATCG ACCATTAAAG CCTGGTGAAC CTTATCCTTT	2883
Val Tyr Gln Leu Glu	
555	
AGGGGCAACT TGGATAGAGG AAGAAGATGG AGTTAATTTT GTACTATTCT CTGAGAACGC	2943
CACAAAAGTA GAACTGTAA CGTACTCTCA GACTAGACAA GATGAGCCAA AGGAAATAAT	3003
AGAACTTAGA CAGAGAACCG GAGATCTCTG GCATGTTTTT GTACCTGGTT TAAGACCAGG	3063
TCAGTTGTAT GGGTACAGGG TGTATGGTCC ATATAAACCA GAGGAAGGGT TAAGGTTTAA	3123
TCCTAATAAA GTACTGATAG ATCCTTATGC AAAAGCTATA AACGGATTAT TACTATGGGA	3183
TGATTCGGTC TTTGGATATA AAATTGGAGA TCAGAACCAG GATCTCAGTT TCGATGAGAG	3243

— 250 —

AAAAGACGAT AAATTTATAC CTAAAGGGGT CATAATAAAT CCTTATTTTG ATTGGGAGGA 3303
 CGAGCATTTC TTCTTTAGAA GAAAGATACC TTTTAAGGAT AGTATAATTT ATGAGACACA 3363
 TATAAAAGGA ATAATAAAT TAAGGCAAGA TTTACCGGAG AACGTTAGAG GCACTTTTTT 3423
 GGGTTTAGCA TCAGATACTA TGATTGATTA CCTAAAAGAT TTAGGAATTA CAACCGTTGA 3483
 GATAATGCCT ATTCAGCAAT TTGTAGATGA GAGATTCATT GTCGATAAAG GGTAAAGAA 3543
 CTACTGGGGT TACAATCCGA TAAATTATTT CTCTCCTGAA TGTAGATACT CAAGCTC 3600

配列番号 : 8

配列の長さ : 556

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

起源 : *Sulfolobus acidocaldarius*

株名 : ATCC33909

配列

Met Phe Ser Phe Gly Gly Asn Ile Glu Lys Asn Lys Gly Ile Phe Lys

1 5 10 15

Leu Trp Ala Pro Tyr Val Asn Ser Val Lys Leu Lys Leu Ser Lys Lys

20 25 30

Leu Ile Pro Met Glu Lys Asn Asp Glu Gly Phe Phe Glu Val Glu Ile

35 40 45

Asp Asp Ile Glu Glu Asn Leu Thr Tyr Ser Tyr Ile Ile Glu Asp Lys

50 55 60

— 251 —

Arg Glu Ile Pro Asp Pro Ala Ser Arg Tyr Gln Pro Leu Gly Val His

65 70 75 80

Asp Lys Ser Gln Leu Ile Arg Thr Asp Tyr Gln Ile Leu Asp Leu Gly

85 90 95

Lys Val Lys Ile Glu Asp Leu Ile Ile Tyr Glu Leu His Val Gly Thr

100 105 110

Phe Ser Gln Glu Gly Asn Phe Lys Gly Val Ile Glu Lys Leu Asp Tyr

115 120 125

Leu Lys Asp Leu Gly Ile Thr Gly Ile Glu Leu Met Pro Val Ala Gln

130 135 140

Phe Pro Gly Asn Arg Asp Trp Gly Tyr Asp Gly Val Phe Leu Tyr Ala

145 150 155 160

Val Gln Asn Thr Tyr Gly Gly Pro Trp Glu Leu Ala Lys Leu Val Asn

165 170 175

Glu Ala His Lys Arg Gly Ile Ala Val Ile Leu Asp Val Val Tyr Asn

180 185 190

His Ile Gly Pro Glu Gly Asn Tyr Leu Leu Gly Leu Gly Pro Tyr Phe

195 200 205

Ser Asp Arg Tyr Lys Thr Pro Trp Gly Leu Thr Phe Asn Phe Asp Asp

210 215 220

Arg Gly Cys Asp Gln Val Arg Lys Phe Ile Leu Glu Asn Val Glu Tyr

225 230 235 240

Trp Phe Lys Thr Phe Lys Ile Asp Gly Leu Arg Leu Asp Ala Val His

245 250 255

— 252 —

Ala Ile Phe Asp Asn Ser Pro Lys His Ile Leu Gln Glu Ile Ala Glu

260

265

270

Lys Ala His Gln Leu Gly Lys Phe Val Ile Ala Glu Ser Asp Leu Asn

275

280

285

Asp Pro Lys Ile Val Lys Asp Asp Cys Gly Tyr Lys Ile Asp Ala Gln

290

295

300

Trp Val Asp Asp Phe His His Ala Val His Ala Phe Ile Thr Lys Glu

305

310

315

320

Lys Asp Tyr Tyr Tyr Gln Asp Phe Gly Arg Ile Glu Asp Ile Glu Lys

325

330

335

Thr Phe Lys Asp Val Phe Val Tyr Asp Gly Lys Tyr Ser Arg Tyr Arg

340

345

350

Gly Arg Thr His Gly Ala Pro Val Gly Asp Leu Pro Pro Arg Lys Phe

355

360

365

Val Val Phe Ile Gln Asn His Asp Gln Val Gly Asn Arg Gly Asn Gly

370

375

380

Glu Arg Leu Ser Ile Leu Thr Asp Lys Thr Thr Tyr Leu Met Ala Ala

385

390

395

400

Thr Leu Tyr Ile Leu Ser Pro Tyr Ile Pro Leu Ile Phe Met Gly Glu

405

410

415

Glu Tyr Tyr Glu Thr Asn Pro Phe Phe Phe Phe Ser Asp Phe Ser Asp

420

425

430

Pro Val Leu Ile Lys Gly Val Arg Glu Gly Arg Leu Lys Glu Asn Asn

435

440

445

— 253 —

Gln Met Ile Asp Pro Gln Ser Glu Glu Ala Phe Leu Lys Ser Lys Leu
 450 455 460
 Ser Trp Lys Ile Asp Glu Glu Val Leu Asp Tyr Tyr Lys Gln Leu Ile
 465 470 475 480
 Asn Ile Arg Lys Arg Tyr Asn Asn Cys Lys Arg Val Lys Glu Val Arg
 485 490 495
 Arg Glu Gly Asn Cys Ile Thr Leu Ile Met Glu Lys Ile Gly Ile Ile
 500 505 510
 Ala Ser Phe Asp Asp Ile Val Ile Asn Ser Lys Ile Thr Gly Asn Leu
 515 520 525
 Leu Ile Gly Ile Gly Phe Pro Lys Lys Leu Lys Lys Asp Glu Leu Ile
 530 535 540
 Lys Val Asn Arg Gly Val Gly Val Tyr Gln Leu Glu
 545 550 555

配列番号 : 9

配列の長さ : 6

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

起源

生物 : *Sulfolobus solfataricus*

— 254 —

株名：KM1

配列

Val Ile Arg Glu Ala Lys

1

5

配列番号：10

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物：Sulfolobus solfataricus

株名：KM1

配列

Ile Ser Ile Arg Gln Lys

1

5

配列番号：11

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

— 255 —

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物：Sulfolobus solfataricus

株名：KM1

配列

Ile Ile Tyr Val Glu

1

5

配列番号：12

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物：Sulfolobus solfataricus

株名：KM1

配列

Met Leu Tyr Val Lys

1

5

— 256 —

配列番号 : 13

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

起源

生物 : *Sulfolobus solfataricus*

株名 : KM1

配列

Ile Leu Ser Ile Asn Glu Lys

1

5

配列番号 : 14

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

起源

生物 : *Sulfolobus solfataricus*

株名 : KM1

— 257 —

配列

Val Val Ile Leu Thr Glu Lys

1

5

配列番号：15

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物：Sulfolobus solfataricus

株名：KM1

配列

Asn Leu Glu Leu Ser Asp Pro Arg Val Lys

1

5

10

配列番号：16

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

— 258 —

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物：Sulfolobus solfataricus

株名：KM1

配列

Met Ile Ile Gly Thr Tyr Arg Leu Gln Leu Asn Lys

1

5

10

配列番号：17

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物：Sulfolobus solfataricus

株名：KM1

配列

Val Ala Val Leu Phe Ser Pro Ile Val

1

5

9

— 259 —

配列番号 : 18

配列の長さ : 11

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

起源

生物 : *Sulfolobus solfataricus*

株名 : KM1

配列

Ile Asn Ile Asp Glu Leu Ile Ile Gln Ser Lys

1

5

10

配列番号 : 19

配列の長さ : 12

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

起源

生物 : *Sulfolobus solfataricus*

株名 : KM1

— 260 —

配列

Glu Leu Gly Val Ser His Leu Tyr Leu Ser Pro Ile

1

5

10

配列番号： 20

配列の長さ： 7

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物：Sulfolobus solfataricus

株名：KM1

配列

Asp Glu Val Phe Arg Glu Ser

1

5

配列番号：21

配列の長さ：4

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

— 261 —

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物：Sulfolobus solfataricus

株名：KM1

配列

Asp Tyr Phe Lys

1

配列番号：22

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物：Sulfolobus solfataricus

株名：KM1

配列

Asp Gly Leu Tyr Asn Pro Lys

1

5

— 262 —

配列番号：23

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物：Sulfolobus solfataricus

株名：KM1

配列

Asp Ile Asn Gly Ile Arg Glu Cys

1

5

配列番号：24

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物：Sulfolobus solfataricus

株名：KM1

— 263 —

配列

Asp Phe Glu Asn Phe Glu Lys

1

5

配列番号 : 25

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

起源

生物 : *Sulfolobus solfataricus*

株名 : KM1

配列

Asp Leu Leu Arg Pro Asn Ile

1

5

配列番号 : 26

配列の長さ : 5

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物：Sulfolobus solfataricus

株名：KM1

配列

Asp Ile Ile Glu Asn

1 5

配列番号：27

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物：Sulfolobus solfataricus

株名：KM1

配列

Asp Asn Ile Glu Tyr Arg Gly

1 5

— 265 —

配列番号 : 28

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

YTCWCKRAAW ACYTCATC

18

配列番号 : 29

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

GATAAYATWG ARTAYAGRGG

20

配列番号 : 30

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：Sulfolobus acidocaldarius

株名：ATCC33909

配列

Arg Asn Pro Glu Ala Tyr Thr Lys

1

5

配列番号：31

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：Sulfolobus acidocaldarius

株名：ATCC33909

配列

Asp His Val Phe Gln Glu Ser His Ser

1

5

配列番号：32

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

— 267 —

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：Sulfolobus acidocaldarius

株名：ATCC33909

配列

Ile Thr Leu Asn Ala Thr Ser Thr

1

5

配列番号：33

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：Sulfolobus acidocaldarius

株名：ATCC33909

配列

Ile Ile Ile Val Glu Lys

1

5

— 268 —

配列番号 : 34

配列の長さ : 11

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

起源 : *Sulfolobus acidocaldarius*

株名 : ATCC 33909

配列

Leu Gln Gln Tyr Met Pro Ala Val Tyr Ala Lys

1

5

10

配列番号 : 35

配列の長さ : 5

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

起源 : *Sulfolobus acidocaldarius*

株名 : ATCC 33909

配列

— 269 —

Asn Met Leu Glu Ser

1 5

配列番号 : 36

配列の長さ : 13

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

起源 : *Sulfolobus acidocaldarius*

株名 : ATCC 33909

配列

Lys Ile Ser Pro Asp Gln Phe His Val Phe Asn Gln Lys

1 5 10

配列番号 : 37

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

起源 : *Sulfolobus acidocaldarius*

— 270 —

株名：ATCC33909

配列

Gln Leu Ala Glu Asp Phe Leu Lys

1

5

配列番号：38

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：Sulfolobus acidocaldarius

株名：ATCC33909

配列

Lys Ile Leu Gly Phe Gln Glu Glu Leu Lys

1

5

10

配列番号：39

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

— 271 —

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：Sulfolobus acidocaldarius

株名：ATCC 33909

配列

Ile Ser Val Leu Ser Glu Phe Pro Glu Glu

1

5

10

配列番号：40

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：Sulfolobus acidocaldarius

株名：ATCC 33909

配列

Leu Lys Leu Glu Glu Gly Ala Ile Tyr

1

5

配列番号：41

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

— 272 —

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：Sulfolobus acidocaldarius

株名：ATCC33909

配列

Glu Val Gln Ile Asn Glu Leu Pro

1

5

配列番号：42

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：Sulfolobus acidocaldarius

株名：ATCC33909

配列

Asp His Ser Arg Ile

1

5

— 273 —

配列番号：43

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：Sulfolobus acidocaldarius

株名：ATCC33909

配列

Asp Leu Arg Tyr Tyr Lys

1

5

配列番号：44

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：Sulfolobus acidocaldarius

株名：ATCC33909

配列

— 274 —

Asp Val Tyr Arg Thr Tyr Ala Asn Gln Ile Val Lys Glu Cys

1 5 10

配列番号 : 45

配列の長さ : 10

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : N端フラグメント

起源

生物 : *Sulfolobus solfataricus*

株名 : KM1

配列

Thr Phe Ala Tyr Lys Ile Asp Gly Asn Glu

1 5 10

配列番号 : 46

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

起源

生物 : *Sulfolobus solfataricus*

株名 : KM1

配列

Leu Gly Pro Tyr Phe Ser Gln

1

5

配列番号 : 47

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

起源

生物 : *Sulfolobus solfataricus*

株名 : KM1

配列

Asp Val Phe Val Tyr Asp Gly

1

5

配列番号 : 48

配列の長さ : 19

配列の型 : アミノ酸

— 276 —

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源

生物：Sulfolobus solfataricus

株名：KM1

配列

Tyr Asn Arg Ile Val Ile Ala Glu Ser Asp Leu Asn Asp Pro Arg Val

1

5

10

15

Val Asn Pro

配列番号：49

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：Sulfolobus acidocaldarius

株名：ATCC33909

配列

Leu Asp Tyr Leu Lys

1

5

— 277 —

配列番号：50

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：Sulfolobus acidocaldarius

株名：ATCC33909

配列

Lys Arg Glu Ile Pro Asp Pro Ala Ser Arg Tyr Gln Pro Leu Gly Val

1

5

10

15

His

17

配列番号：51

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：Sulfolobus acidocaldarius

株名：ATCC33909

— 278 —

配列

Lys Asp Val Phe Val Tyr Asp Gly Lys

1

5

配列番号 : 52

配列の長さ : 9

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

起源 : *Sulfolobus acidocaldarius*

株名 : ATCC33909

配列

His Ile Leu Gln Glu Ile Ala Glu Lys

1

5

配列番号 : 53

配列の長さ : 10

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

— 279 —

起源 : *Sulfolobus acidocaldarius*

株名 : ATCC 33909

配列

Lys Leu Trp Ala Pro Tyr Val Asn Ser Val

1

5

10

配列番号 : 54

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

フラグメント型 : 中間部フラグメント

起源 : *Sulfolobus acidocaldarius*

株名 : ATCC 33909

配列

Met Phe Ser Phe Gly Gly Asn

1

5

配列番号 : 55

配列の長さ : 14

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

— 280 —

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：Sulfolobus acidocaldarius

株名：ATCC 33909

配列

Asp Tyr Try Tyr Gln Asp Phe Gly Arg Ile Glu Asp Ile Glu

1

5

10

配列番号：56

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：Sulfolobus acidocaldarius

株名：ATCC 33909

配列

Lys Ile Asp Ala Gln Trp Val

1

5

配列番号：57

配列の長さ：18

配列の型：核酸

— 281 —

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

AGCWAGKAGM TAYCARCC

18

配列番号：58

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

YTTHCCATCR TAWACRAAWA CATC

24

請 求 の 範 囲

1. 少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が $\alpha-1, 4$ 結合である3糖以上の糖を基質とし、その還元末端の $\alpha-1, 4$ 結合を $\alpha-1, \alpha-1$ 結合に転移させる作用を有する新規トランスフェラーゼ。

2. すべてのグルコース残基が $\alpha-1, 4$ 結合であるマルトオリゴ糖を基質とし、その還元末端の $\alpha-1, 4$ 結合を $\alpha-1, \alpha-1$ 結合に転移させる作用を有する新規トランスフェラーゼ。

3. SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量が約74000～76000である、請求項1または2に記載の酵素。

4. 下記の理化学的性質を有する、請求項1～3のいずれか一項に記載の酵素。

(1) 至適pH: 4.5～6.0

(2) 至適温度: 60～80℃

(3) 安定pH: 4.5～10.0

(4) 温度安定性: 80℃で6時間の処理により90%以上残存

5. 等電点電気泳動法による等電点が5.3～6.3である、請求項1～4のいずれか一項に記載の酵素。

6. 5 mM CuSO_4 で100%阻害される、請

求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の酵素。

7. *Sulfolobales* 目の古細菌から得られる、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の酵素。

8. *Sulfolobus* 属に属する細菌から得られる、請求項 7 に記載の酵素。

9. *Acidianus* 属に属する細菌から得られる、請求項 7 に記載の酵素。

10. *Sulfolobus* 属に属する細菌が *Sulfolobus solfataricus* KM1 株 (FERM BP-4626) である、請求項 8 に記載の酵素。

11. *Sulfolobus* 属に属する細菌が *Sulfolobus solfataricus* DSM-5833 株である、請求項 8 に記載の酵素。

12. *Sulfolobus* 属に属する細菌が *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 株である、請求項 8 に記載の酵素。

13. *Acidianus* 属に属する細菌が *Acidianus briarleyi* DSM 1651 株である、請求項 9 に記載の酵素。

14. 請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載のトランスフェラーゼ産生能を有する細菌を培地に培養し、培養物より、マルトオリゴ糖を基質としてトレハロースオリゴ糖を生成する活性を指標とする活性測定法に基づい

て、該トランスフェラーゼを単離精製することを特徴とする請求項1～13のいずれか一項に記載のトランスフェラーゼの製造法。

15. *Sulfolobales* 目の古細菌を培養する、請求項14に記載の製造法。

16. *Sulfolobus* 属に属する細菌を培養する、請求項15に記載の製造法。

17. *Acidianus* 属に属する細菌を培養する、請求項15に記載の製造法。

18. *Sulfolobus* 属に属する
Sulfolobus solfataricus
KM1株 (FERM BP-4626) を培養する、請求項16に記載の製造法。

19. *Sulfolobus* 属に属する
Sulfolobus solfataricus
DSM 5833株を培養する、請求項16に記載の製造法。

20. *Sulfolobus* 属に属する
Sulfolobus acidocaldarius
ATCC 33909株を培養する、請求項16に記載の製造法。

21. *Acidianus* 属に属する
Acidianus brieryleyi DSM
1651株を培養する、請求項17に記載の製造法。

22. 請求項1～13のいずれか一項に記載の酵素を用い、少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が $\alpha-1, 4$ 結合である3糖以上の糖を基質として作用させ、少なくとも還元末端側の3糖がグルコース単位で構成され、該末端側の1つ目と2つ目のグルコース間の結合が $\alpha-1, \alpha-1$ 結合で、該末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の結合が $\alpha-1, 4$ 結合である糖を製造することを特徴とする末端の2糖が $\alpha-1, \alpha-1$ 結合である糖の製造法。

23. マルトオリゴ糖各単独またはそれらの混合物を基質として用いる、請求項22に記載の製造法。

24. グルコシルトレハロース、マルトオリゴシルトレハロース等のトレハロースオリゴ糖を製造する、請求項23に記載の製造法。

25. 少なくとも還元末端から3つ以上の糖がグルコース単位で構成される3糖以上の糖を基質とし、還元末端側から加水分解して主に単糖及び／又は2糖を遊離する活性を有する新規アミラーゼ。

26. 少なくとも還元末端側の3糖がグルコース単位で構成され、該末端側の1つ目と2つ目のグルコース間の結合が $\alpha-1, \alpha-1$ 結合で、該末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の結合が $\alpha-1, 4$ 結合である3糖以上の糖を基質とし、2つ目と3つ目のグルコース間の $\alpha-1, 4$ 結合を加水分解し、 α, α -トレハロース

を遊離する主要な活性を有する請求項 25 に記載の新規アミラーゼ。

27. 基質の分子鎖中の $\alpha-1, 4$ 結合をエンド型で加水分解する活性を合わせ持つ、請求項 25 或いは 26 に記載の新規アミラーゼ。

28. グルコシルトレハロース、マルトオリゴシルトレハロース等のトレハロースオリゴ糖を基質とし、還元末端側の 2 つ目と 3 つ目のグルコース間の $\alpha-1, 4$ 結合を加水分解し、 α, α -トレハロースを遊離する活性を有する、請求項 25、26 或いは 27 に記載の新規アミラーゼ。

29. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による分子量が約 61,000 ~ 64,000 である、請求項 25 ~ 28 のいずれか一項に記載の酵素。

30. 下記の理化学的性質を有する、請求項 25 ~ 29 のいずれか一項に記載の酵素。

- (1) 至適 pH : 4.5 ~ 5.5
- (2) 至適温度 : 60 ~ 85 °C
- (3) 安定 pH : 4.0 ~ 10.0
- (4) 温度安定性 : 80 °C で 6 時間の処理により 100 % 残存

31. 等電点電気泳動法による等電点が 4.3 ~ 5.4 である、請求項 25 ~ 30 のいずれか一項に記載の酵素。

32. 5 mM CuSO_4 で 100% 阻害される、請求項 25 ~ 31 のいずれか一項に記載の酵素。

33. *Sulfolobales* 目に属する古細菌から得られる、請求項 25 ~ 32 のいずれか一項に記載の酵素。

34. *Sulfolobus* 属に属する古細菌から得られる、請求項 33 に記載の酵素。

35. *Sulfolobus* 属に属する古細菌が *Sulfolobus solfataricus* KM1 株 (FERM BP-4626) 或いはその変異株である、請求項 34 に記載の酵素。

36. *Sulfolobus* 属に属する古細菌が *Sulfolobus solfataricus* DSM 5833 株或いはその変異株である、請求項 34 に記載の酵素。

37. *Sulfolobus* 属に属する古細菌が *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909 株或いはその変異株である、請求項 34 に記載の酵素。

38. 請求項 25 ~ 37 のいずれか一項に記載のアミラーゼを産生する能力を有する細菌を培地に培養し、培養物より、トレハロースオリゴ糖を基質として α , α -トレハロースを生成する活性を指標とする活性測定法に基づいて、該アミラーゼを単離精製することを特徴と

する請求項 25 ～ 37 のいずれか一項に記載のアミラーゼの製造法。

39. *Sulfolobales* 目の古細菌を培養する、請求項 38 に記載のアミラーゼの製造法。

40. *Sulfolobus* 属に属する細菌を培養する、請求項 39 に記載のアミラーゼの製造法。

41. *Sulfolobus* 属に属する
Sulfolobus solfataricus
KM1 株 (FERM BP-4626) を培養する、請求項 40 に記載のアミラーゼの製造法。

42. *Sulfolobus* 属に属する
Sulfolobus solfataricus
DSM 5833 株を培養する、請求項 40 に記載のアミラーゼの製造法。

43. *Sulfolobus* 属に属する
Sulfolobus acidocaldarius
ATCC 33909 株を培養する、請求項 40 に記載のアミラーゼの製造法。

44. 請求項 25 ～ 37 のいずれか一項に記載の新規アミラーゼと、少なくとも還元末端から 3 つ以上のグルコース残基が $\alpha-1, 4$ 結合である 3 糖以上の糖を基質としてその還元末端の $\alpha-1, 4$ 結合を $\alpha-1, \alpha-1$ 結合に転移させる作用を有するトランスフェラーゼとを組み合わせ用いることを特徴とする α, α -トレハ

ロースの製造法。

45. 該アミラーゼ及び該トランスフェラーゼを 60～80℃で作用させる、請求項44に記載の α , α -トレハロースの製造法。

46. 該アミラーゼ及び該トランスフェラーゼの反応液中の濃度がそれぞれ1.5 Units/ml及び0.1 Unit/ml以上である、請求項44或いは45に記載の α , α -トレハロースの製造法。

47. 該アミラーゼ及び該トランスフェラーゼの反応液中の濃度がそれぞれ1.5 Units/ml及び1 Unit/ml以上であり、かつアミラーゼ対トランスフェラーゼの濃度比が0.075～1.00である、請求項44或いは45に記載の α , α -トレハロースの製造法。

48. 該アミラーゼ及び該トランスフェラーゼの反応液中の濃度がそれぞれ1.5 Units/ml及び1 Unit/ml以上であり、かつアミラーゼ対トランスフェラーゼの濃度比が3～4.0である、請求項47に記載の α , α -トレハロースの製造法。

49. 少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が α -1,4結合である3糖以上の糖を基質として用いる、請求項44～48のいずれか一項に記載の α , α -トレハロースの製造法。

50. デンプン又はデンプン分解物を基質として用いる、請求項44～48のいずれか一項に記載の α , α

ートレハロースの製造法。

51. デンプン分解物が酸分解或いは酵素分解によって製造されるデンプン分解物である、請求項50に記載の α , α -トレハロースの製造法。

52. デンプン分解物が枝切り酵素を用いて得られるものである、請求項51に記載の α , α -トレハロースの製造法。

53. 枝切り酵素がプルラナーゼ或いはイソアミラーゼである、請求項52に記載の α , α -トレハロースの製造法。

54. すべてのグルコース残基が α -1, 4結合であるマルトオリゴ糖を各単独又はそれらの混合物として基質に用いる、請求項第44~48のいずれか一項に記載の α , α -トレハロースの製造法。

55. 更に枝切り酵素を組み合わせて用いる、請求項44或いは45に記載の α , α -トレハロースの製造法。

56. 枝切り酵素がプルラナーゼ或いはイソアミラーゼである、請求項55に記載の α , α -トレハロースの製造法。

57. α , α -トレハロースの製造のいずれかの段階でプルラナーゼ或いはイソアミラーゼを1回以上組み合わせて用いる、請求項56に記載の α , α -トレハロースの製造法。

58. α , α -トレハロースの製造の初期段階でプルラナーゼ或いはイソアミラーゼを1回以上組み合わせて用いる、請求項57に記載の α , α -トレハロースの製造法。

59. デンプン又はデンプン分解物を基質として用いる、請求項55～58のいずれか一項に記載の α , α -トレハロースの製造法。

60. デンプン分解物が酸分解或いは酵素分解によって製造されるデンプン分解物である、請求項59に記載の α , α -トレハロースの製造法。

61. デンプン分解物が枝切り酵素を用いて得られるものである、請求項60に記載の α , α -トレハロースの製造法。

62. 枝切り酵素がプルラナーゼ或いはイソアミラーゼである、請求項61に記載の α , α -トレハロースの製造法。

63. 該トランスフェラーゼとして、
Sulfolobales目に属する古細菌由来の酵素を用いる、請求項44～62のいずれか一項に記載の α , α -トレハロースの製造法。

64. 該トランスフェラーゼとして、
Sulfolobus属に属する古細菌から得られる酵素を用いる、請求項63に記載の α , α -トレハロースの製造法。

65. 該トランスフェラーゼとして、
A c i d i a n u s 属に属する古細菌から得られる酵素
を用いる、請求項63に記載の α ， α -トレハロースの
製造法。

66. 該トランスフェラーゼとして、
S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
K M 1 株 (F E R M B P - 4 6 2 . 6) 或いはその変異
株から得られる酵素を用いる、請求項64に記載の α ，
 α -トレハロースの製造法。

67. 該トランスフェラーゼとして、
S u l f o l o b u s s o l f a t a r i c u s
D S M 5 8 3 3 株或いはその変異株から得られる酵素
を用いる、請求項64に記載の α ， α -トレハロースの
製造法。

68. 該トランスフェラーゼとして、
S u l f o l o b u s a c i d o c a l d a r i u s
A T C C 3 3 9 0 9 株或いはその変異株から得られる
酵素を用いる、請求項64に記載の α ， α -トレハロー
スの製造法。

69. 該トランスフェラーゼとして、
A c i d i a n u s b r i e r l e y i D S M
1 6 5 1 株或いはその変異株から得られる酵素を用いる、
請求項65に記載の α ， α -トレハロースの製造法。

70. 請求項1記載の新規トランスフェラーゼをコ

ードする D N A 配列を含んでなる、D N A 断片。

7 1. 前記新規トランスフェラーゼの至適温度が 6 0 ~ 8 0 °C である、請求項 7 0 記載の D N A 断片。

7 2. 図 2 6 に示される制限酵素地図で表される、請求項 7 0 または 7 1 記載の D N A 断片。

7 3. 図 2 9 に示される制限酵素地図で表される、請求項 7 0 または 7 1 記載の D N A 断片。

7 4. 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列またはその等価配列をコードする D N A 配列を含んでなる、D N A 断片。

7 5. 配列番号 1 に示される塩基配列の 3 3 5 番から 2 5 1 8 番までの塩基配列を含んでなる、請求項 7 4 記載の D N A 断片。

7 6. 配列番号 1 に示される塩基配列の 1 番から 2 5 7 8 番までの塩基配列を含んでなる、請求項 7 4 記載の D N A 断片。

7 7. 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列またはその等価配列をコードする D N A 配列を含んでなる、D N A 断片。

7 8. 配列番号 3 に示される塩基配列の 8 1 6 番から 2 8 5 5 番までの塩基配列を含んでなる、請求項 7 7 記載の D N A 断片。

7 9. 配列番号 3 に示される塩基配列の 1 番から 3 4 6 7 番までの塩基配列を含んでなる、請求項 7 7 記

載の D N A 断片。

80. *Sulfolobales* 目に属する古細菌由来である、請求項 70 ~ 79 のいずれか一項記載の D N A 断片。

81. *Sulfolobus* 属に属する古細菌由来である、請求項 80 に記載の D N A 断片。

82. *Sulfolobus solfataricus* K M 1 株由来である、請求項 81 に記載の D N A 断片。

83. *Sulfolobus acidocaldarius* A T C C 33909 株由来である、請求項 81 に記載の D N A 断片。

84. 配列番号 1 に示される塩基配列の 335 番から 2518 番までの塩基配列、またはその相補体に、40℃、5 x S S C のイオン強度下でハイブリッドを形成し、かつ少なくとも還元末端から 3 つ以上のグルコース残基が α - 1, 4 結合である三糖以上の糖を基質とし、その還元末端の α - 1, 4 結合を α - 1, α - 1 結合に転移させる作用を有する新規トランスフェラーゼをコードする D N A 断片、および該 D N A 断片によりコードされるアミノ酸配列をコードする D N A 断片。

85. 配列番号 1 に示される塩基配列の 1880 番から 2257 番までの塩基配列、またはその相補体に、60℃、6 x S S P E のイオン強度下でハイブリッドを

形成し、かつ少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が α -1, 4結合である三糖以上の糖を基質とし、その還元末端の α -1, 4結合を α -1, α -1結合に転移させる作用を有する新規トランスフェラーゼをコードするDNA断片、および該DNA断片によりコードされるアミノ酸配列をコードするDNA断片。

86. 配列番号2に示されるアミノ酸配列またはその等価配列を含んでなる、ポリペプチド。

87. 配列番号4に示されるアミノ酸配列またはその等価配列を含んでなる、ポリペプチド。

88. 少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が α -1, 4結合である三糖以上の糖を基質とし、その還元末端の α -1, 4結合を α -1, α -1結合に転移させる作用を有する、請求項86または87に記載のポリペプチド。

89. 前記作用の至適温度が60～80℃である、請求項86～88のいずれか一項記載のポリペプチド。

90. 請求項70～85のいずれか一項記載のDNA断片を含んでなる、組換えDNA分子。

91. 請求項70～85のいずれか一項記載のDNA断片がプラスミドベクターに組み込まれてなる、請求項90記載の組換えDNA分子。

92. プラスミドpKT22である、請求項90または91記載の組換えDNA分子。

93. プラスミド p9T01 である、請求項 90 または 91 記載の組換え DNA 分子。

94. 請求項 90～93 のいずれか一項記載の組換え DNA 分子によって形質転換された、宿主細胞。

95. 宿主細胞が *Escherichia* 属または *Bacillus* 属に属する微生物である、請求項 94 に記載の宿主細胞。

96. 宿主細胞が *Escherichia coli* JM109 株である、請求項 95 に記載の宿主細胞。

97. 少なくとも還元末端から 3 つ以上のグルコース残基が α -1, 4 結合である三糖以上の糖を基質とし、その還元末端の α -1, 4 結合を α -1, α -1 結合に転移させる作用を有する組換え新規トランスフェラーゼの製造法であって、

請求項 94～96 のいずれか一項記載の宿主細胞を培養し、その培養物中に前記組換え新規トランスフェラーゼを生成させ、これを採取することを含んでなる、方法。

98. 請求項 70～85 のいずれか一項記載の DNA 断片によりコードされる組換え新規トランスフェラーゼ、または請求項 86～89 のいずれか一項記載のポリペプチドを含んでなる組換え新規トランスフェラーゼの製造法であって、

請求項 94～96 のいずれか一項記載の宿主細胞を培

養し、その培養物中に前記組換え新規トランスフェラーゼを生成させ、これを採取することを含んでなる、方法。

99. 少なくとも還元末端側の三糖がグルコース単位で構成され、該末端側の1つ目と2つ目のグルコース間の結合が $\alpha - 1, 4$ 結合で、該末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の結合が $\alpha - 1, 4$ 結合であるトレハロースオリゴ糖の製造法であって、

請求項97または98で得られた組換え新規トランスフェラーゼを、少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が $\alpha - 1, 4$ 結合である三糖以上の糖と接触させることを含んでなる、方法。

100. 請求項25記載の新規アミラーゼをコードするDNA配列を含んでなる、DNA断片。

101. 請求項26記載の新規アミラーゼをコードするDNA配列を含んでなる、請求項100記載のDNA断片。

102. 糖鎖中の $\alpha - 1, 4$ 結合をエンド型で加水分解する活性を有する新規アミラーゼをコードするDNA配列を含んでなる、請求項100または101記載のDNA断片。

103. 前記新規アミラーゼが、トレハロースオリゴ糖を基質とし、還元末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の $\alpha - 1, 4$ 結合を加水分解し、 α, α -トレハロースを遊離する活性を有するものである、請求項

1 0 0 ~ 1 0 2 のいずれか一項記載の D N A 断片。

1 0 4 . (1) 糖鎖中の α - 1 , 4 グルコシド結合をエンド型で加水分解する活性、

(2) 少なくとも還元末端から 3 つ以上の糖がグルコース単位で構成され、かつその結合が α - 1 , 4 結合である 3 糖以上の糖を基質とし、還元末端側から加水分解して主に単糖および / または 2 糖を遊離する活性、および

(3) 少なくとも還元末端側の 3 糖がグルコース単位で構成され、該末端側の 1 つ目と 2 つ目のグルコース間の結合が α - 1 , α - 1 結合であり、かつ該末端側の 2 つ目と 3 つ目のグルコース間の結合が α - 1 , 4 結合である 3 糖以上の糖を基質とし、2 つ目と 3 つ目のグルコース間の α - 1 , 4 結合を加水分解し、 α , α - トレハロースを遊離する主要な活性を有する新規アミラーゼをコードする D N A 配列を含んでなる、D N A 断片。

1 0 5 . 前記新規アミラーゼの至適温度が 6 0 ~ 8 5 °C である、請求項 1 0 0 ~ 1 0 4 のいずれか一項記載の D N A 断片。

1 0 6 . 図 3 4 に示される制限酵素地図で表される、請求項 1 0 0 ~ 1 0 5 のいずれか一項記載の D N A 断片。

1 0 7 . 図 3 8 に示される制限酵素地図で表される、請求項 1 0 0 ~ 1 0 5 のいずれか一項記載の D N A 断片。

108. 配列番号6に示されるアミノ酸配列、またはその等価配列をコードするDNA配列を含んでなる、DNA断片。

109. 配列番号5に示される塩基配列の642番から2315番までの塩基配列を含んでなる、請求項108記載のDNA断片。

110. 配列番号5に示される塩基配列の639番から2315番までの塩基配列を含んでなる、請求項108記載のDNA断片。

111. 配列番号5に示される塩基配列の1番から2691番までの塩基配列を含んでなる、請求項108記載のDNA断片。

112. 配列番号8に示されるアミノ酸配列、またはその等価配列をコードするDNA配列を含んでなる、DNA断片。

113. 配列番号7に示される塩基配列の1176番から2843番までの塩基配列を含んでなる、請求項112記載のDNA断片。

114. 配列番号7に示される塩基配列の1番から3600番までの塩基配列を含んでなる、請求項112記載のDNA断片。

115. Sulfobales目に属する古細菌由来である、請求項100～114のいずれか一項記載のDNA断片。

116. *Sulfolobus* 属に属する古細菌由来である、請求項115記載のDNA断片。

117. *Sulfolobus solfataricus* KM1株由来である、請求項116記載のDNA断片。

118. *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC 33909株由来である、請求項116記載のDNA断片。

119. 配列番号5に示される塩基配列の639番または642番から2315番までの塩基配列、またはその相補体に、40℃、5×SSCのイオン強度下でハイブリッドを形成し、かつ少なくとも還元末端から3つ以上の糖がグルコース単位で構成された3糖以上の糖を基質とし、還元末端側から加水分解して、主に単糖および／または2糖を遊離する活性を有する新規アミラーゼをコードするDNA断片、および該DNA断片によりコードされるアミノ酸配列をコードするDNA断片。

120. 配列番号5に示される塩基配列の639番または642番から2315番までの塩基配列、またはその相補体に、40℃、5×SSCのイオン強度下でハイブリッドを形成し、かつ、少なくとも還元末端側の3糖がグルコース単位で構成され、該末端側の1つ目と2つ目のグルコース間の結合が α -1, α -1結合であり、かつ該末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の結合が

α - 1, 4 結合である 3 糖以上の糖を基質とし、2 つ目と 3 つ目のグルコース間の α - 1, 4 結合を加水分解し、 α , α - トレハロースを遊離する主要な活性を有する新規アミラーゼをコードする DNA 断片、および該 DNA 断片によりコードされるアミノ酸配列をコードする DNA 断片。

1 2 1. 配列番号 7 に示される塩基配列の 1 3 9 3 番から 2 1 2 1 番までの塩基配列、またはその相補体に、60℃、6 x S S P E のイオン強度下でハイブリッドを形成し、かつ少なくとも還元末端から 3 つ以上の糖がグルコース単位で構成された 3 糖以上の糖を基質とし、還元末端側から加水分解して、主に単糖および／または 2 糖を遊離する活性を有する新規アミラーゼをコードする DNA 断片、および該 DNA 断片によりコードされるアミノ酸配列をコードする DNA 断片。

1 2 2. 配列番号 7 に示される塩基配列の 1 3 9 3 番から 2 1 2 1 番までの塩基配列、またはその相補体に、60℃、6 x S S P E のイオン強度下でハイブリッドを形成し、かつ少なくとも還元末端側の 3 糖がグルコース単位で構成され、該末端側の 1 つ目と 2 つ目のグルコース間の結合が α - 1, α - 1 結合であり、かつ該末端側の 2 つ目と 3 つ目のグルコース間の結合が α - 1, 4 結合である 3 糖以上の糖を基質とし、2 つ目と 3 つ目のグルコース間の α - 1, 4 結合を加水分解し、 α , α - ト

レハロースを遊離する主要な活性を有する新規アミラーゼをコードするDNA断片、および該DNA断片によりコードされるアミノ酸配列をコードするDNA断片。

123. 配列番号6に示されるアミノ酸配列またはその等価配列を含んでなる、ポリペプチド。

124. 配列番号8に示されるアミノ酸配列またはその等価配列を含んでなる、ポリペプチド。

125. そのN末端に更にMetを有してなる、請求項123に記載のポリペプチド。

126. 少なくとも還元末端側の三糖がグルコース単位で構成され、該末端側の1つ目と2つ目のグルコース間の結合が α -1, α -1結合で、該末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の結合が α -1, 4結合である、3糖以上の糖を基質とし、2つ目と3つ目のグルコース間の α -1, 4結合を加水分解し、 α , α -トレハロースを遊離する作用を有する、請求項123～125のいずれか一項記載のポリペプチド。

127. (1) 糖鎖中の α -1, 4グルコシド結合をエンド型で加水分解する活性、

(2) 少なくとも還元末端から3つ以上の糖がグルコース単位で構成され、かつその結合が α -1, 4結合である3糖以上の糖を基質とし、還元末端側から加水分解して単糖および／または2糖を遊離する活性、および

(3) 少なくとも還元末端側の3糖がグルコース単位

で構成され、該末端側の1つ目と2つ目のグルコース間の結合が α -1, α -1結合であり、かつ該末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の結合が α -1, 4結合である3糖以上の糖を基質とし、2つ目と3つ目のグルコース間の α -1, 4結合を加水分解し、 α , α -トレハロースを遊離する主要な活性を有する、請求項123~125のいずれか一項記載のポリペプチド。

128. 作用の至適温度が60~85℃である、請求項123~127のいずれか一項記載のポリペプチド。

129. 請求項100~122のいずれか一項記載のDNA断片を含んでなる、組換えDNA分子。

130. 請求項100~122のいずれか一項記載のDNA断片がプラスミドベクターに組み込まれてなる、請求項129記載の組換えDNA分子。

131. プラスミドpKA2である、請求項129または130記載の組換えDNA分子。

132. プラスミドp09A1である、請求項129または130記載の組換えDNA分子。

133. 請求項129~132のいずれか一項記載の組換えDNA分子によって形質転換された、宿主細胞。

134. 宿主細胞が*Escherichia*属または*Bacillus*属に属する微生物である、請求項133記載の宿主細胞。

135. 宿主細胞が *Escherichia coli* JM109 株である、請求項134記載の宿主細胞。

136. 組換え新規アミラーゼの製造法であって、
該組換え新規アミラーゼが

少なくとも還元末端側の3糖がグルコース単位で構成され、該末端側の1つ目と2つ目のグルコース間の結合が α -1, α -1 結合であり、かつ該末端側の2つ目と3つ目のグルコース間の結合が α -1, 4 結合である3糖以上の糖を基質とし、2つ目と3つ目のグルコース間の α -1, 4 結合を加水分解し、 α , α -トレハロースを遊離する主要な活性を有するものであり、

請求項133～135のいずれか一項記載の宿主細胞を培養し、その培養物中に前記組換え新規アミラーゼを生成させ、これを採取することを含んでなる、方法。

137. 請求項100～122のいずれか一項記載のDNA断片によりコードされる組換え新規アミラーゼ、または請求項123～128のいずれか一項記載のポリペプチドを含んでなる組換え新規アミラーゼの製造法であって、

請求項133～135のいずれか一項記載の宿主細胞を培養し、その培養物中に前記組換え新規アミラーゼを生成させ、これを採取することを含んでなる、方法。

138. α , α -トレハロースの製造法であって、請求項1～13のいずれか一項記載の新規トランスフェラーゼまたは請求項97もしくは98で得られた組換え新規トランスフェラーゼ、および

請求項136または137で得られた組換え新規アミラーゼとを、

少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が α -1, 4結合である3糖以上の糖と接触させる工程を含んでなる、方法。

139. α , α -トレハロースの製造法であって、請求項97または98で得られた組換え新規トランスフェラーゼ、および

請求項25～37のいずれか一項記載の新規アミラーゼまたは請求項136もしくは137で得られた組換え新規アミラーゼとを、

少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が α -1, 4結合である3糖以上の糖と接触させる工程を含んでなる、方法。

140. 少なくとも還元末端から3つ以上のグルコース残基が α -1, 4結合である3糖以上の糖がデンプンまたはデンプン分解物である、請求項138または139記載の方法。

141. デンプン分解物が、デンプンを酸分解、または酵素分解することによってに製造されたものである、

請求項 1 4 0 記載の方法。

1 4 2. デンプン分解物が、デンプンの枝切り酵素による分解産物である、請求項 1 4 0 記載の方法。

1 4 3. 枝切り酵素がプルラナーゼまたはイソアミラーゼである、請求項 1 4 2 記載の方法。

1 4 4. 少なくとも還元末端から 3 つ以上のグルコース残基が α - 1, 4 結合である 3 糖以上の糖が、全てのグルコース残基が α - 1, 4 結合であるマルトオリゴ糖の単独または混合物である、請求項 1 3 8 または 1 3 9 記載の方法。

1 4 5. 5 0 ~ 8 5 °C の温度で実施される、請求項 1 3 8 ~ 1 4 4 のいずれか一項記載の方法。

1/44

FIG. 1A

反応前

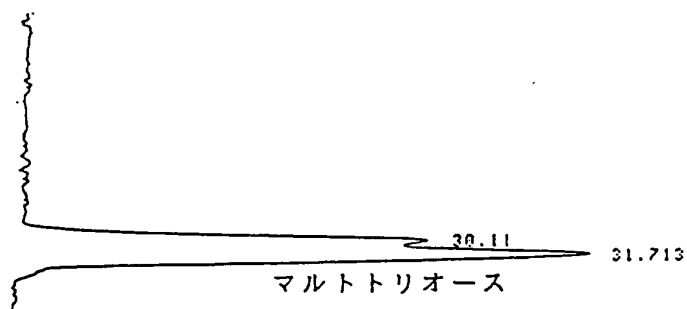
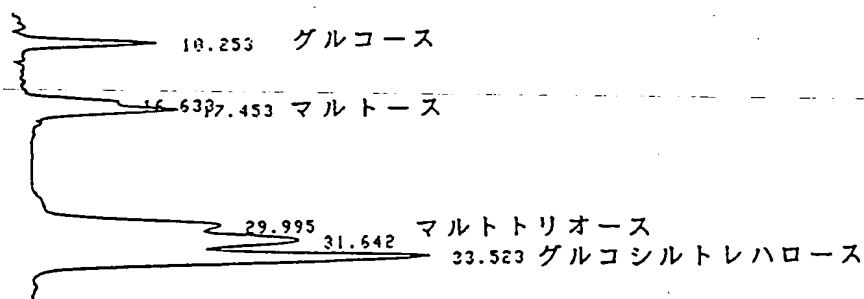


FIG. 1B

反応後



2/44

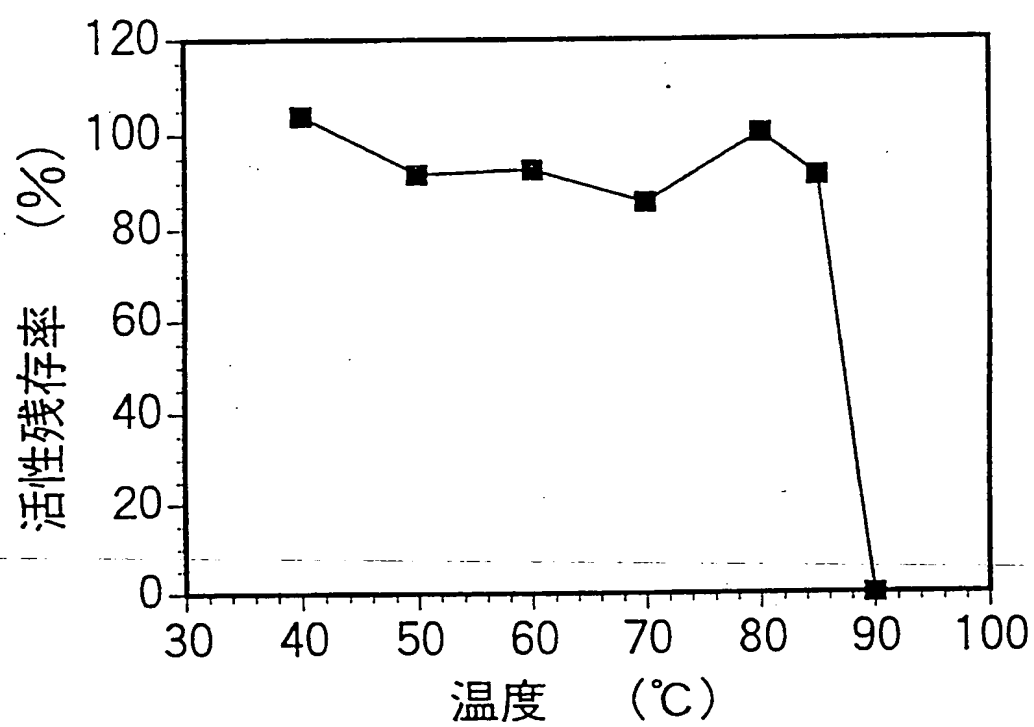


FIG. 2

3/44

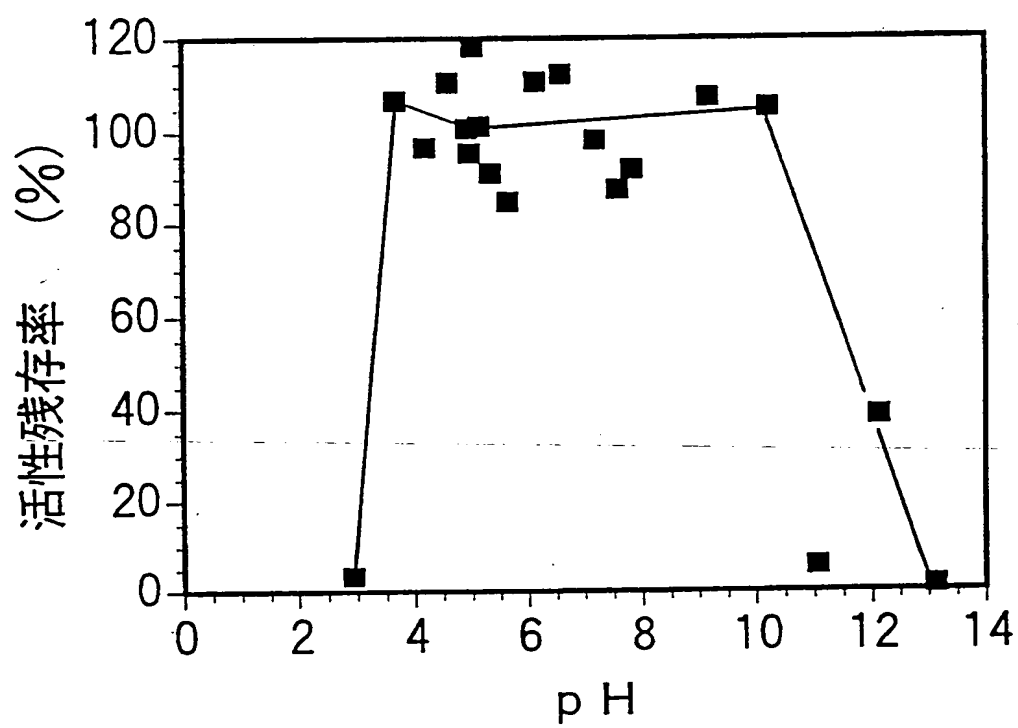


FIG. 3

4/44

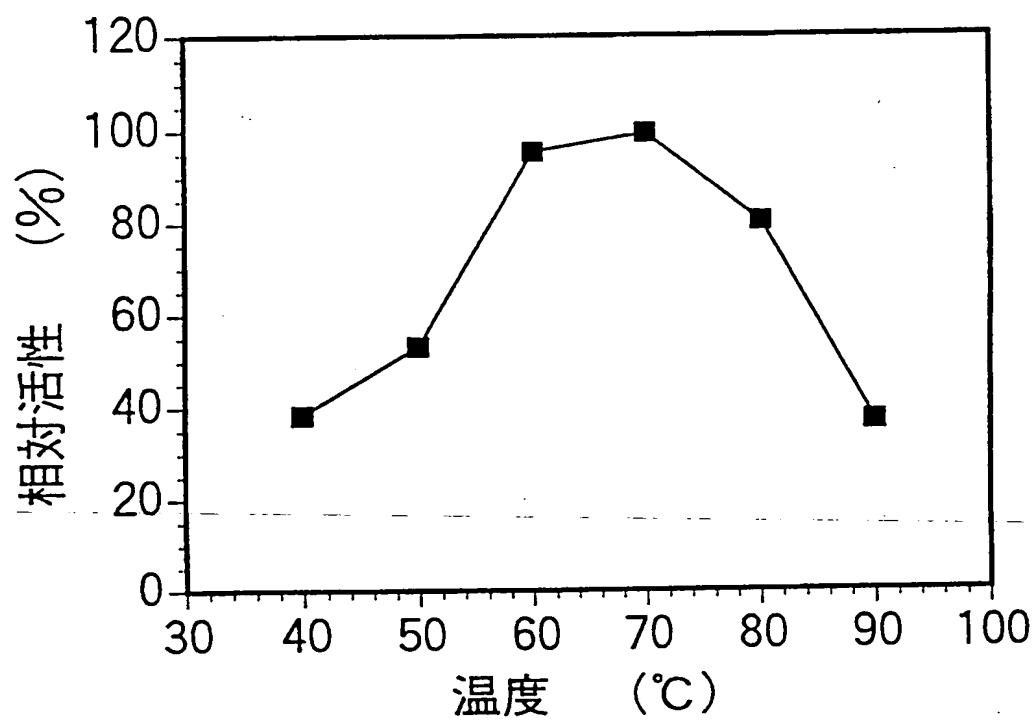


FIG. 4

5/44

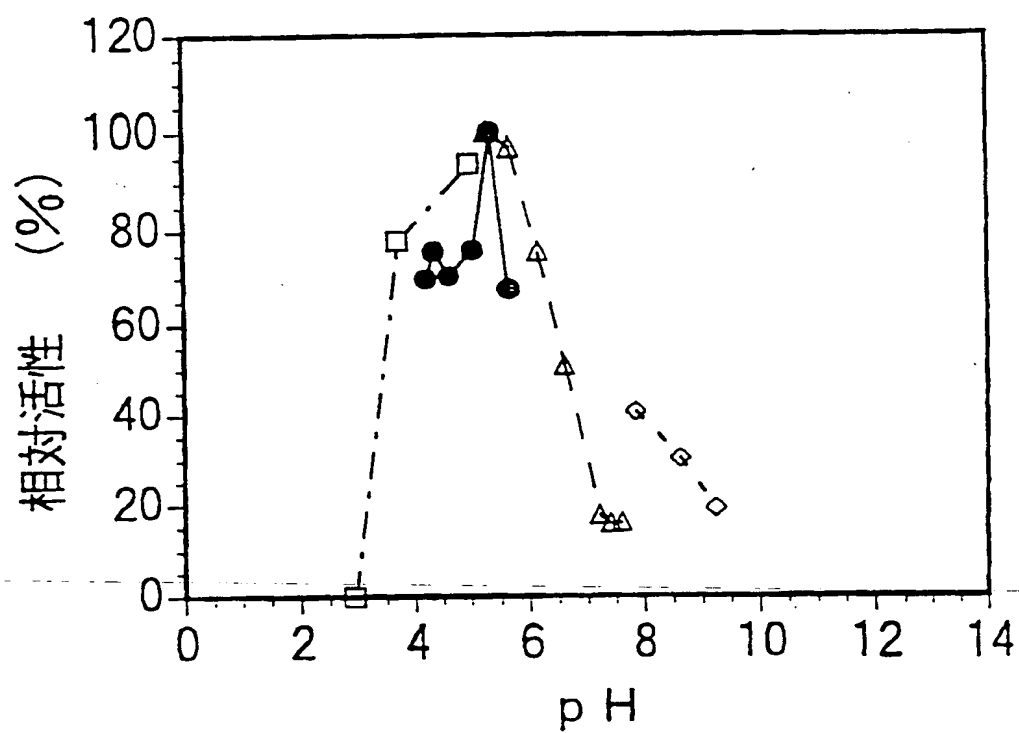


FIG. 5

6/44

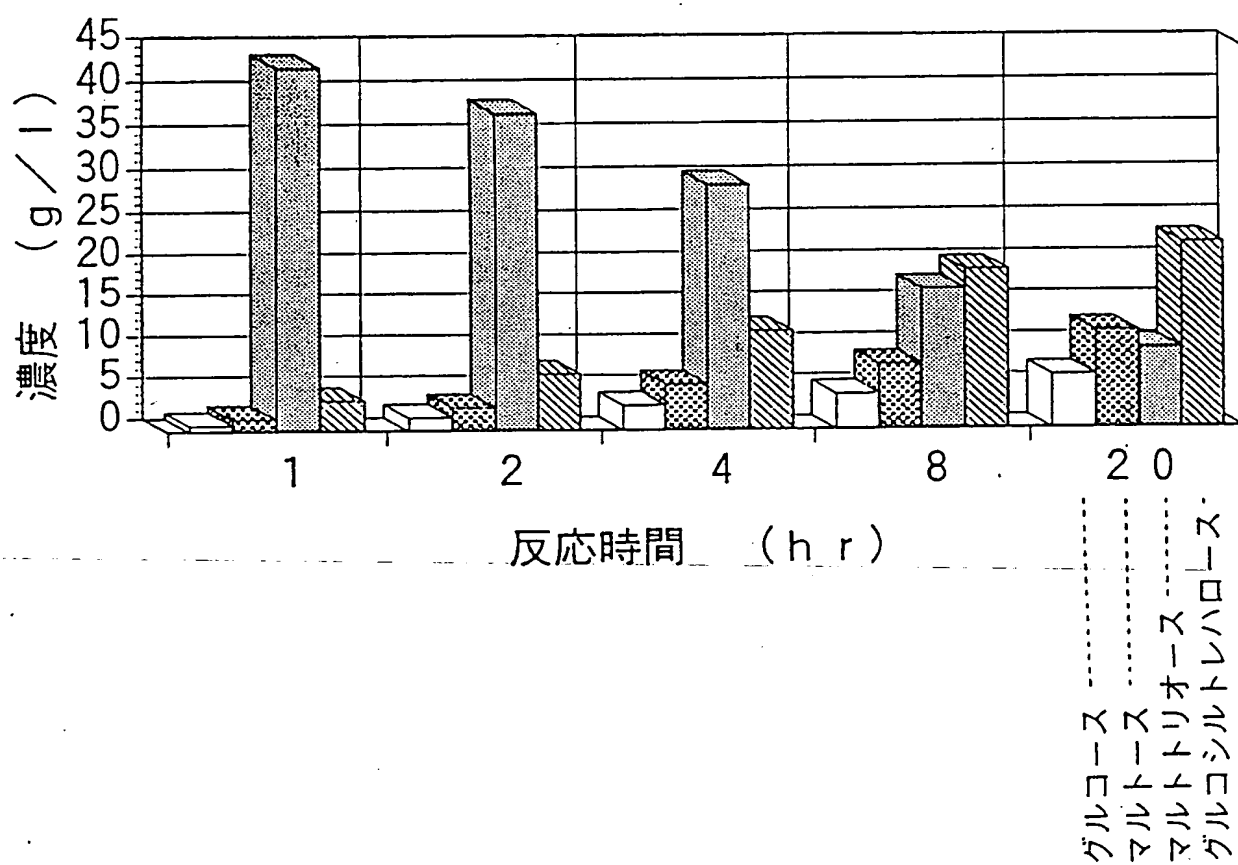


FIG. 6

7/44

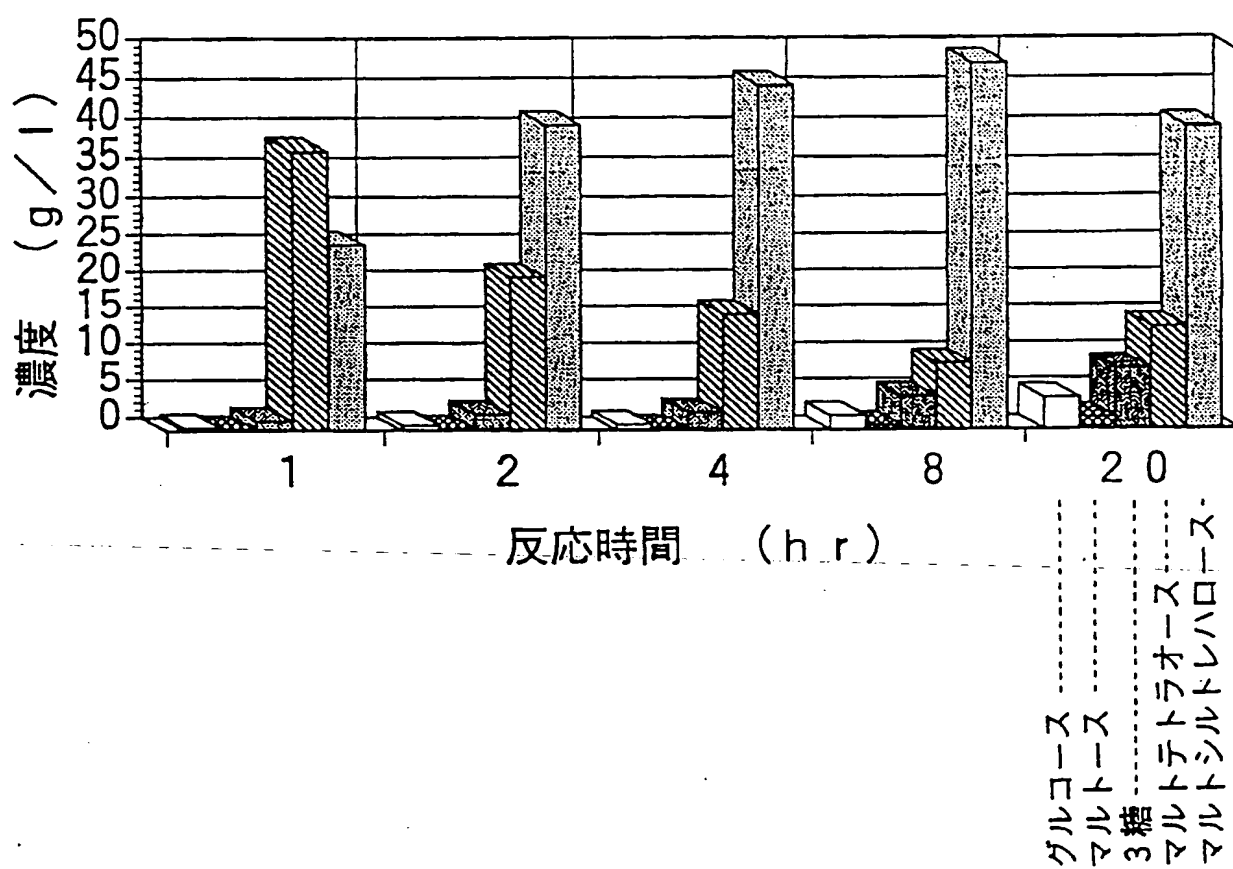


FIG. 7

8/44

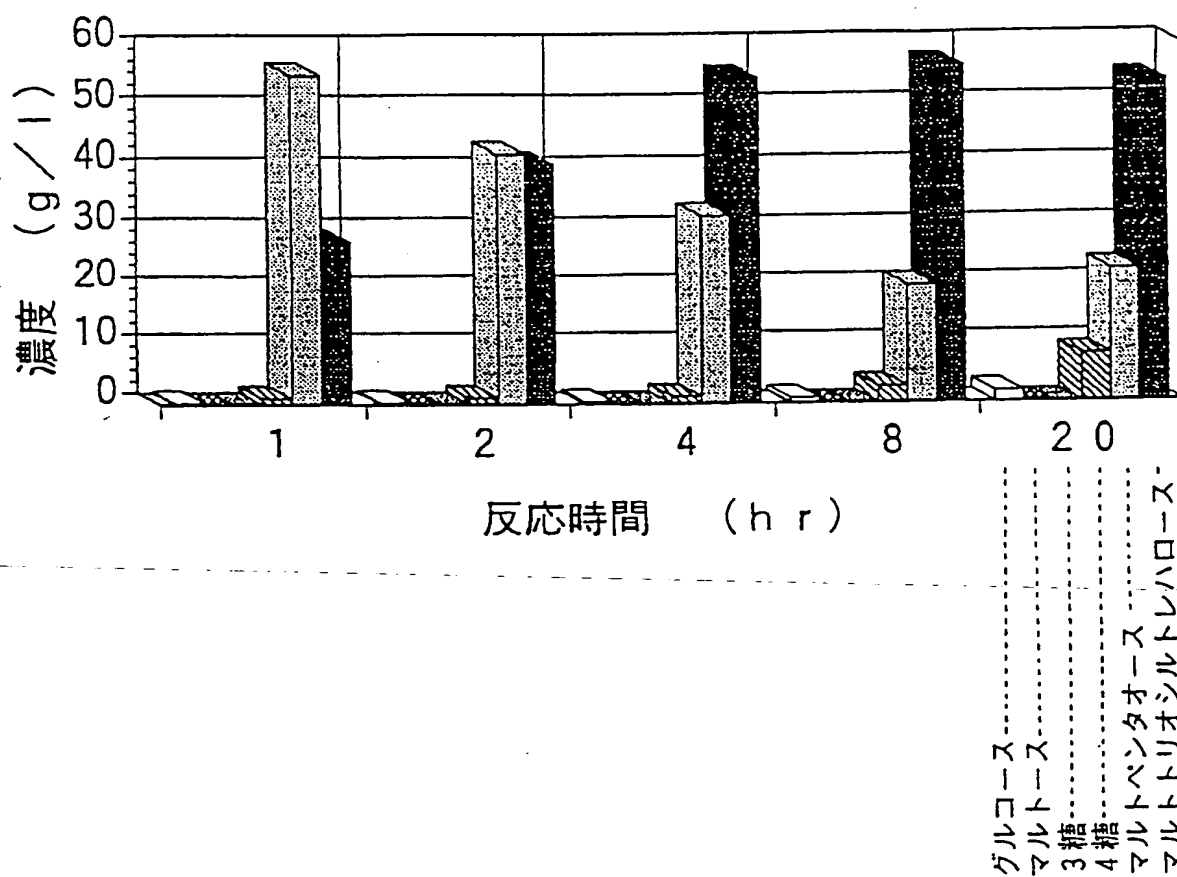


FIG. 8

9/44

反応生成物

FIG. 9A

..... 8.61 7 糖
..... 9.28 6 糖
..... 10.08 5 糖
..... 11.12 4 糖
..... 12.45 3 糖
..... 14.52 2 糖
..... 16.64 1 糖

対照 (アミラーゼのみによる分解物)

FIG. 9B

..... 8.91 7 糖
..... 9.61 6 糖
..... 10.53 5 糖
..... 11.63 4 糖
..... 12.93 3 糖
..... 14.51 2 糖
..... 16.48 1 糖

10/44

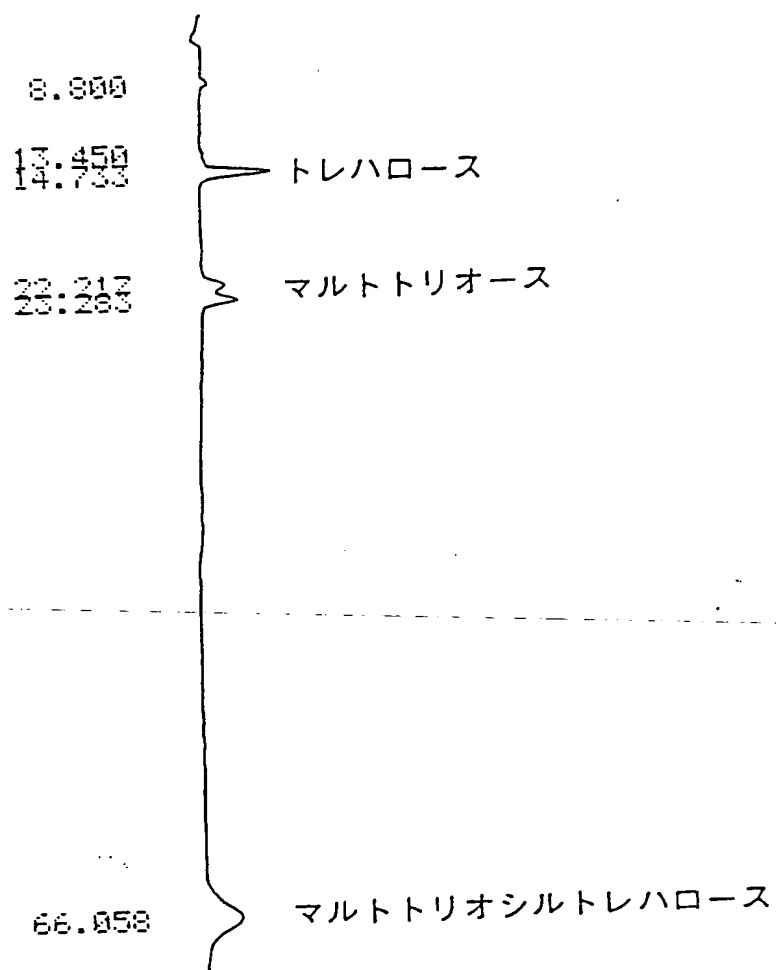


FIG. 10

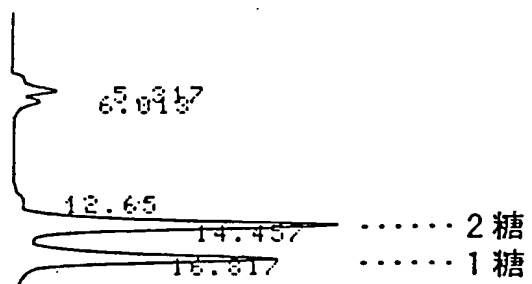
11/44

FIG. 11

12/44

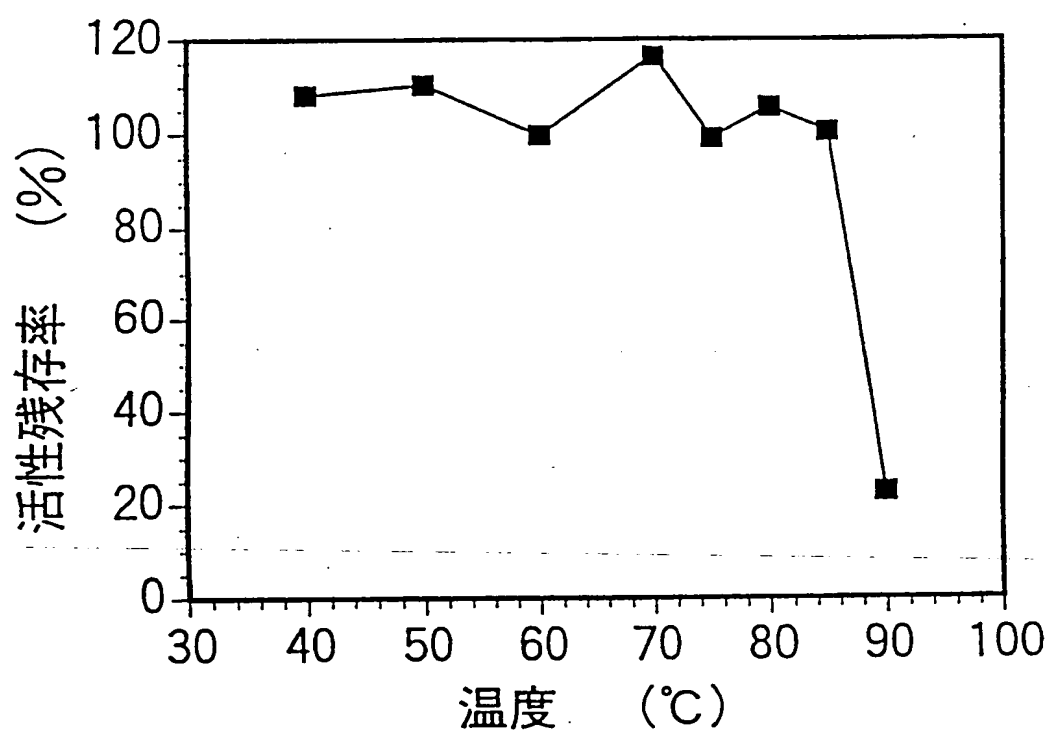


FIG. 12

13/44

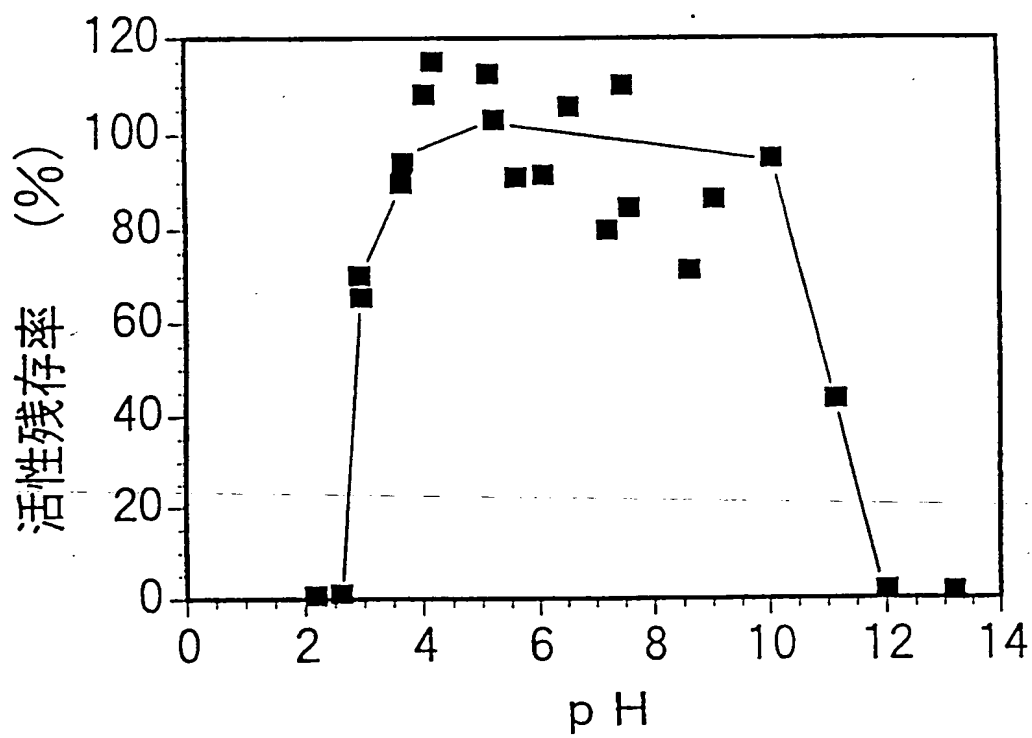


FIG. 13

14/44

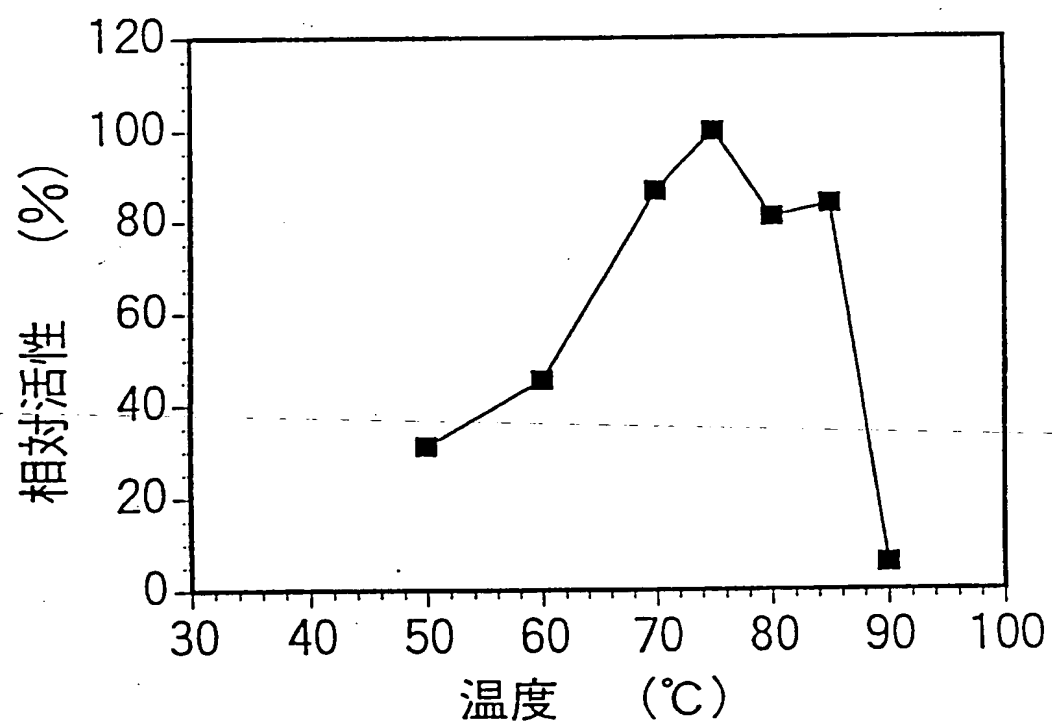


FIG. 14

15/44

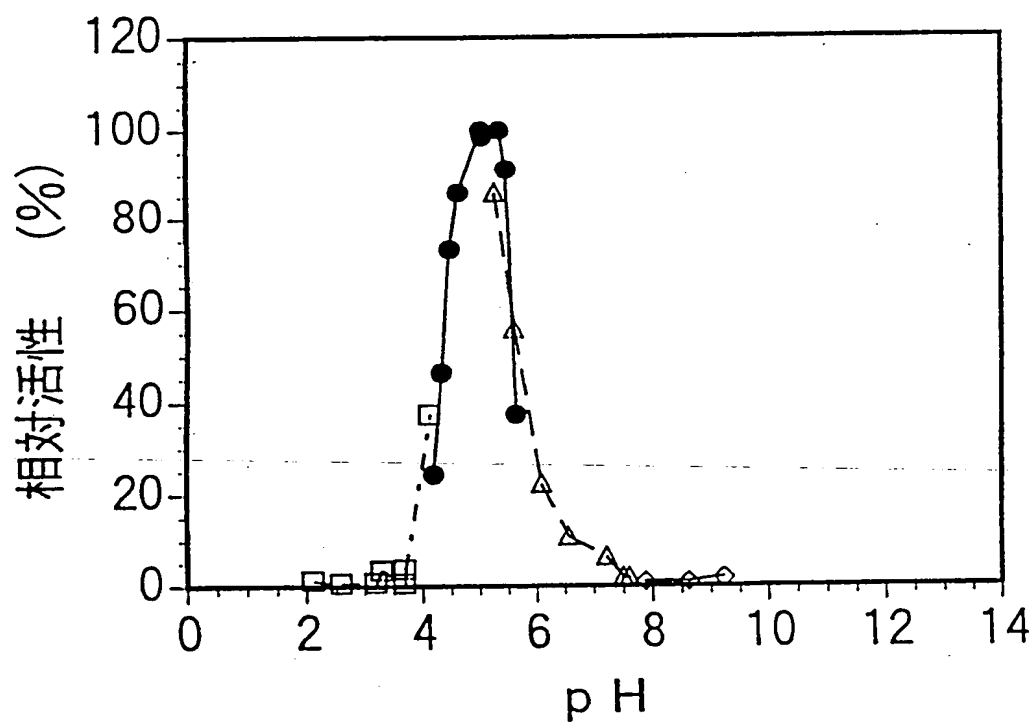


FIG. 15

16/44

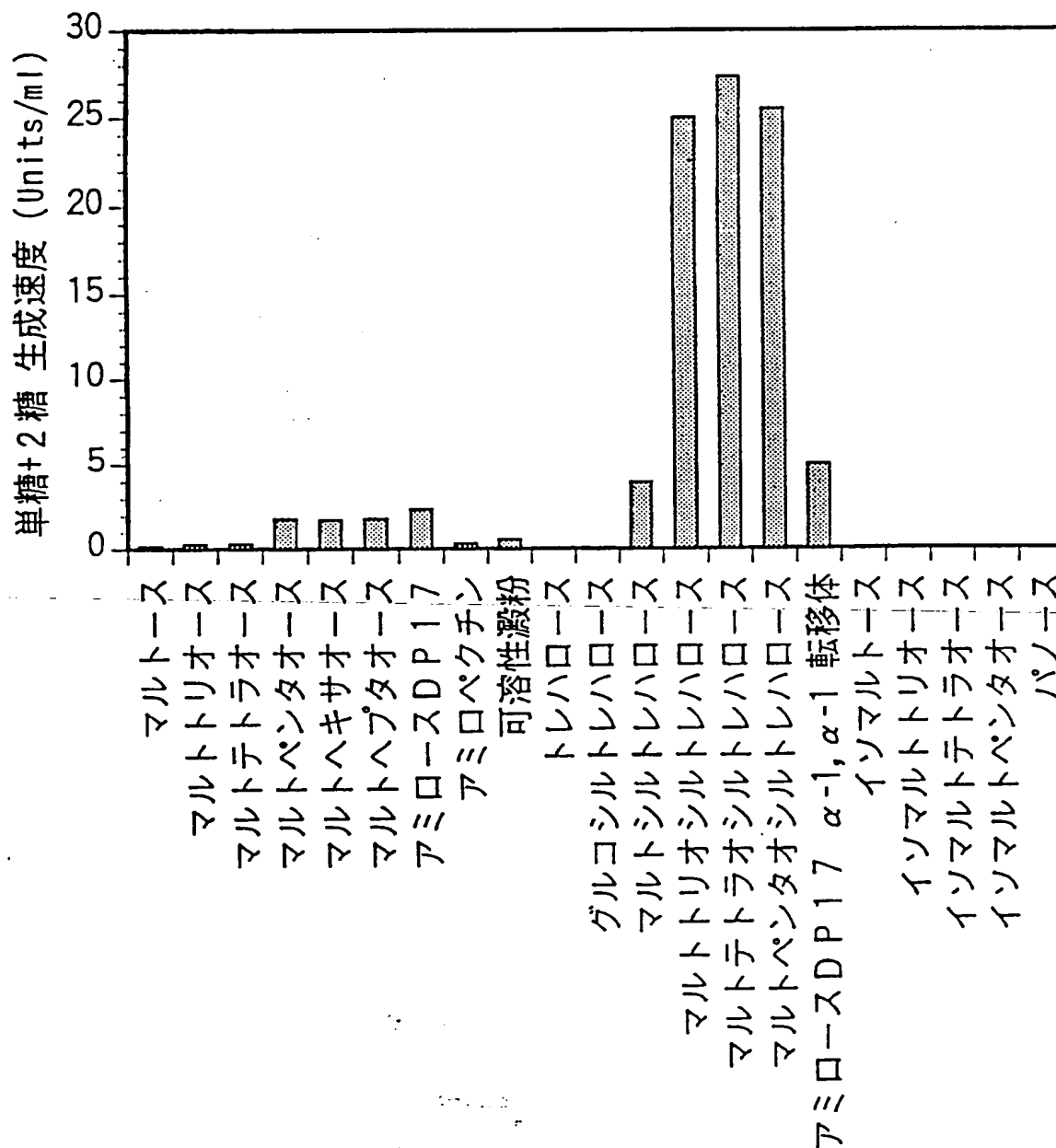
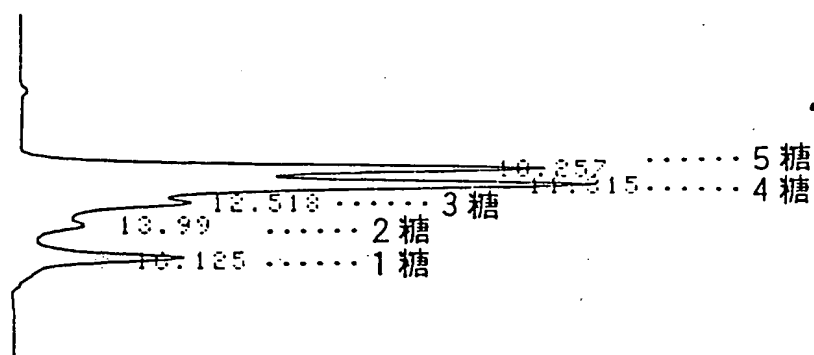


FIG. 16

17/44

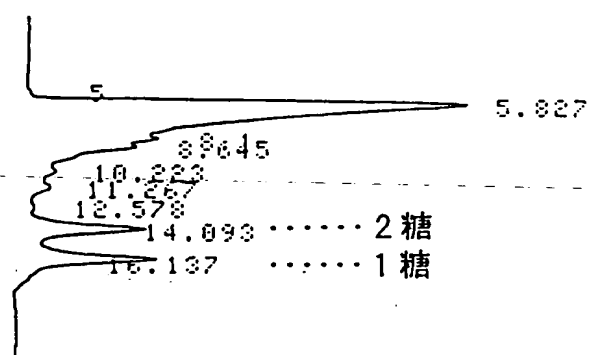
基質：マルトペンタオース

FIG. 17A



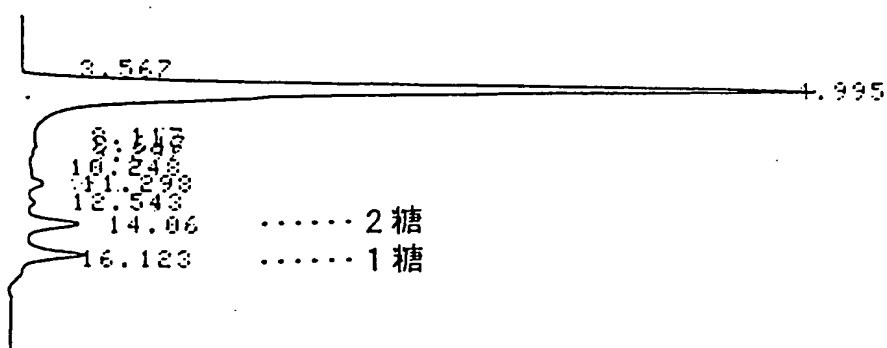
基質：アミロース DP 17

FIG. 17B



基質：可溶性澱粉

FIG. 17C



18/44

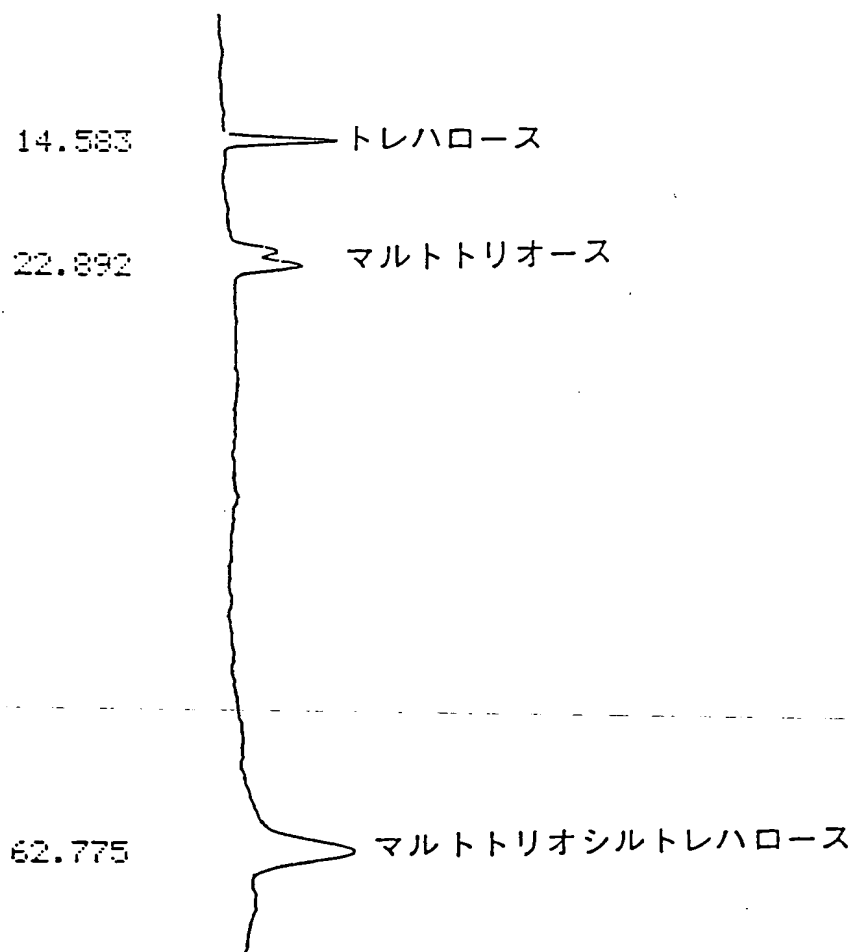


FIG. 18

19/44

14.608

トレハロース

59.683
62.325

マルトペンタオース

マルトペンタオシルトレハロース

FIG. 19

20/44

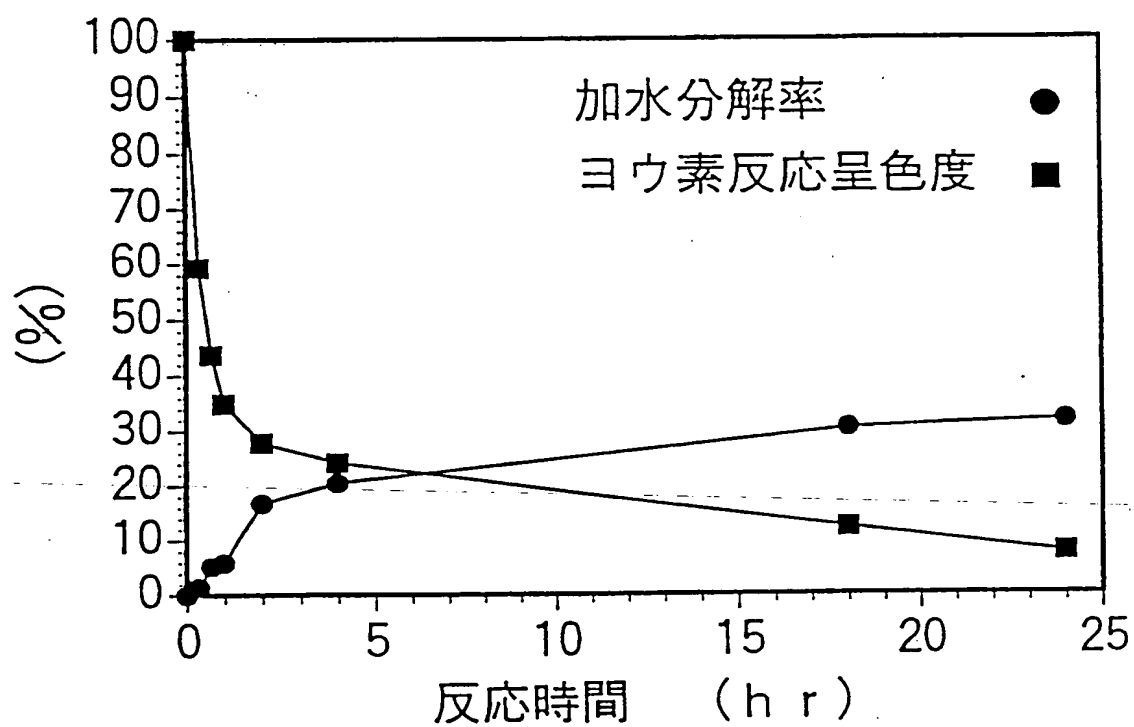


FIG. 20

21/44

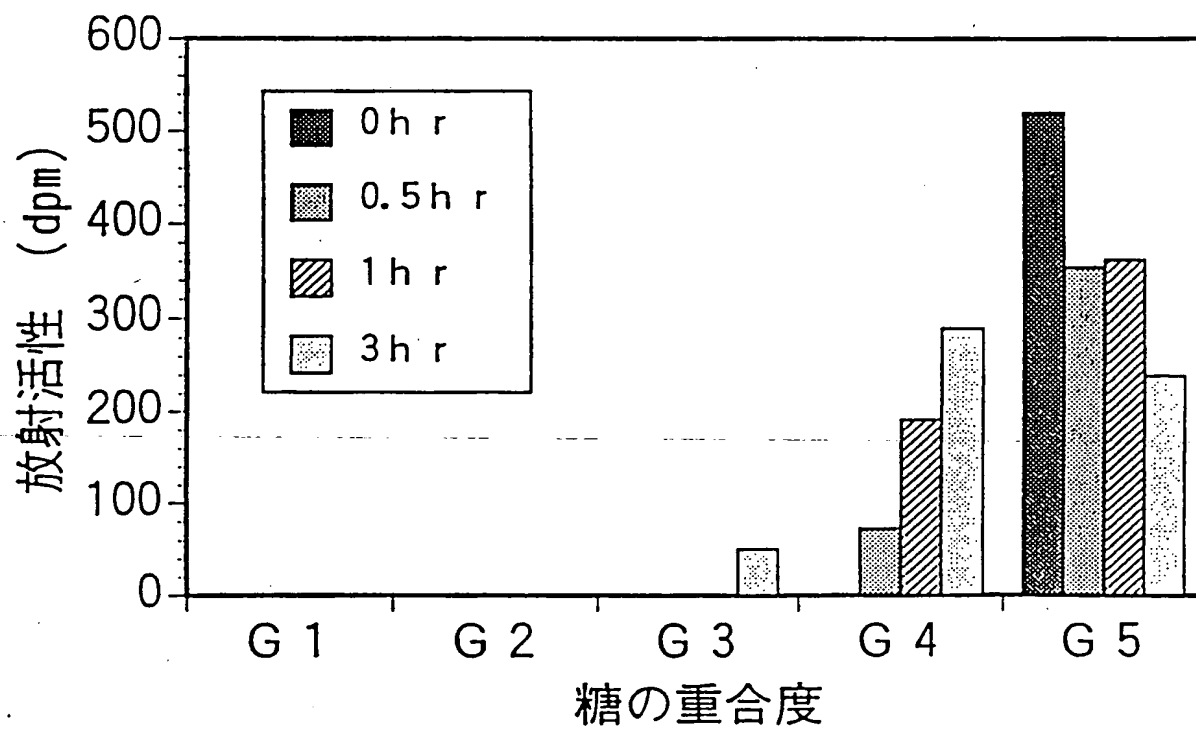


FIG. 21

22/44

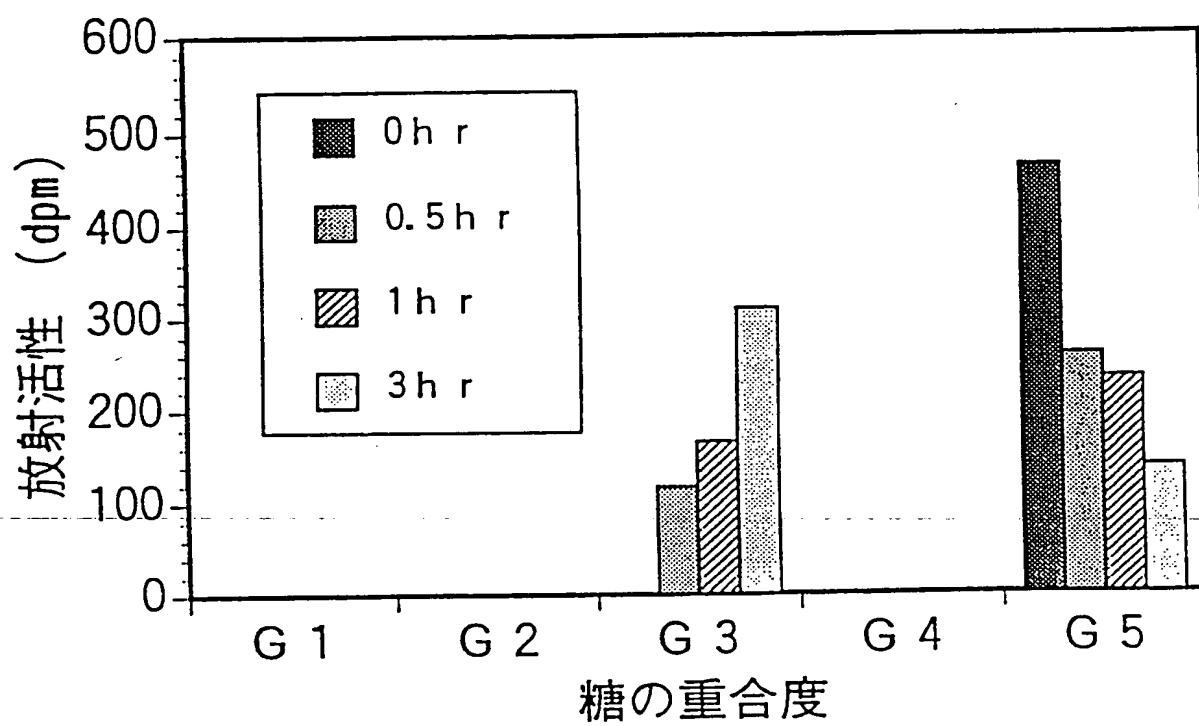


FIG. 22

23/44

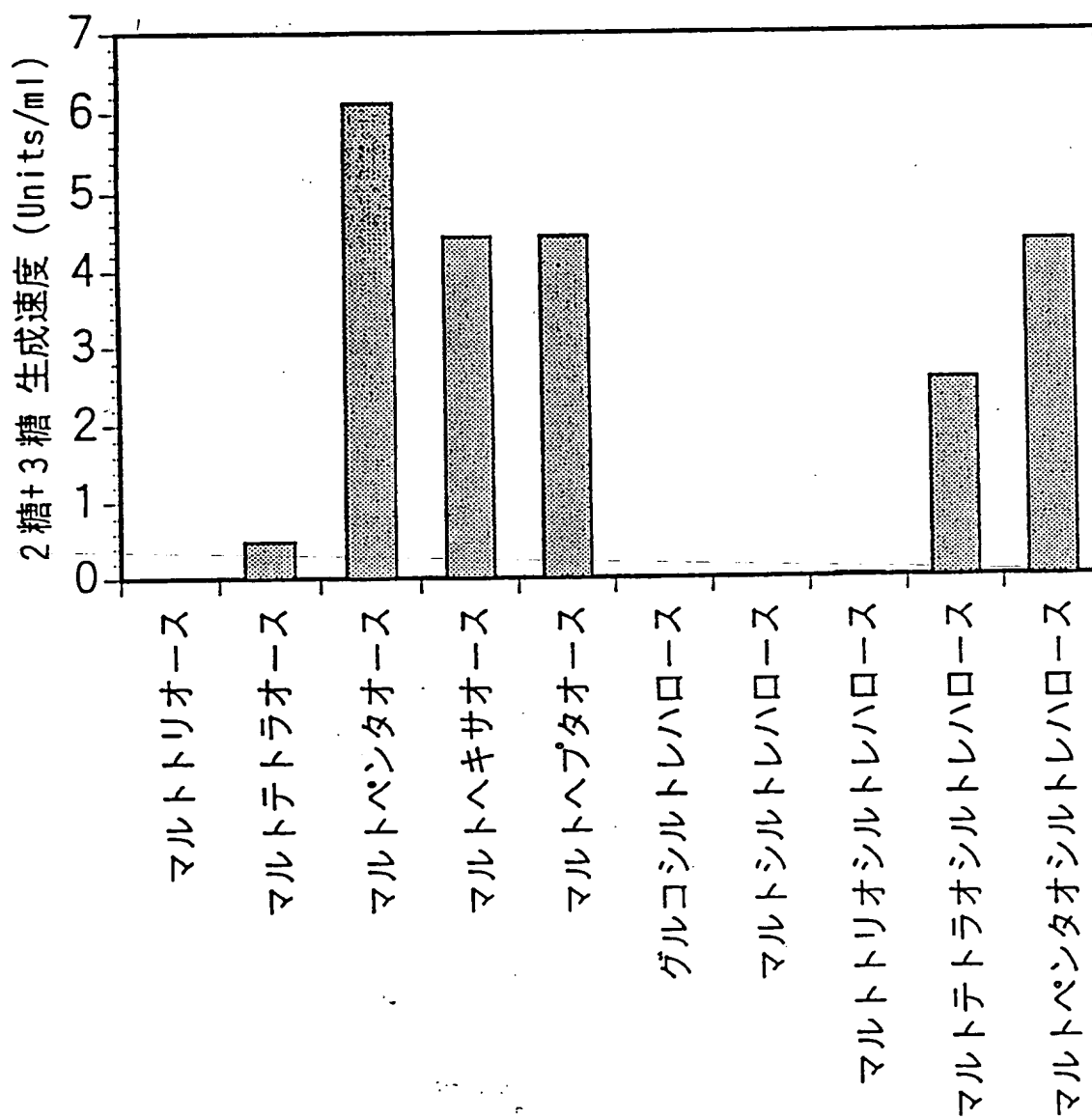


FIG. 23

24/44

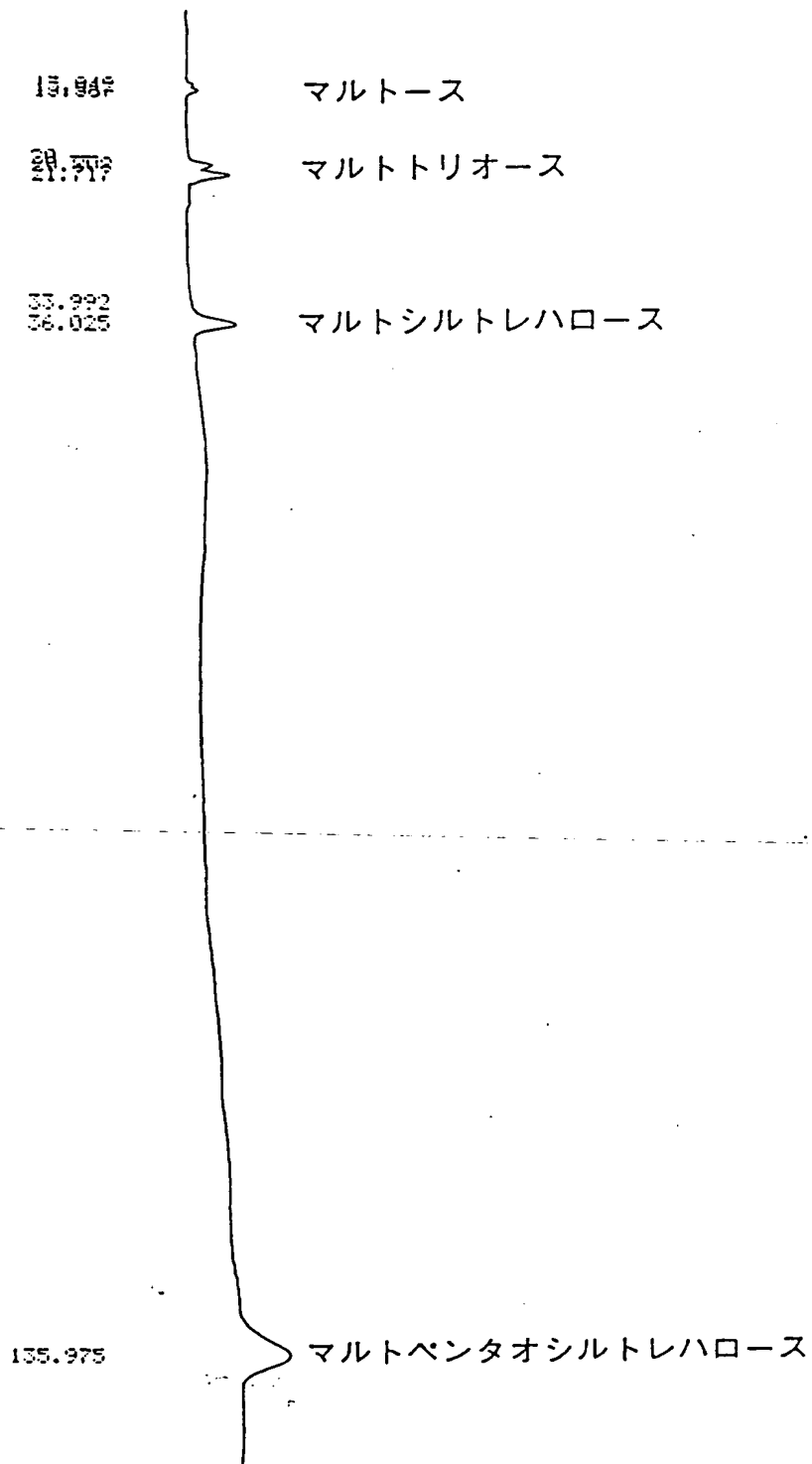


FIG. 24

25/44

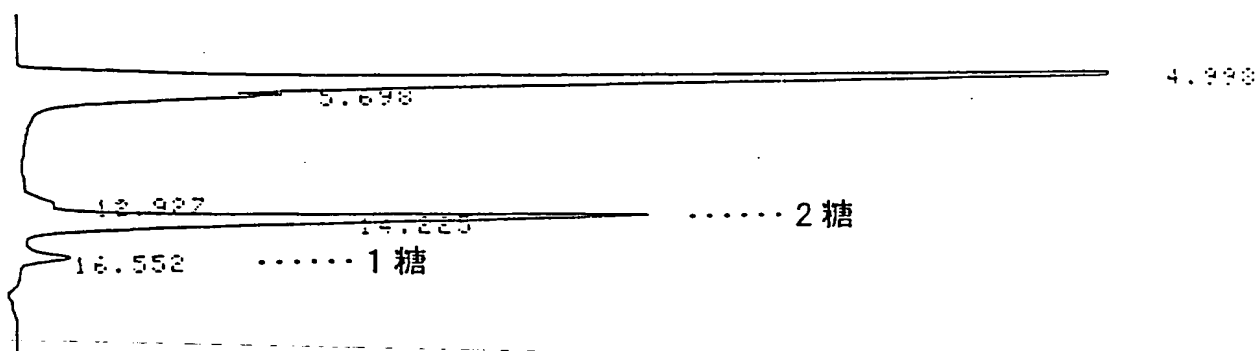
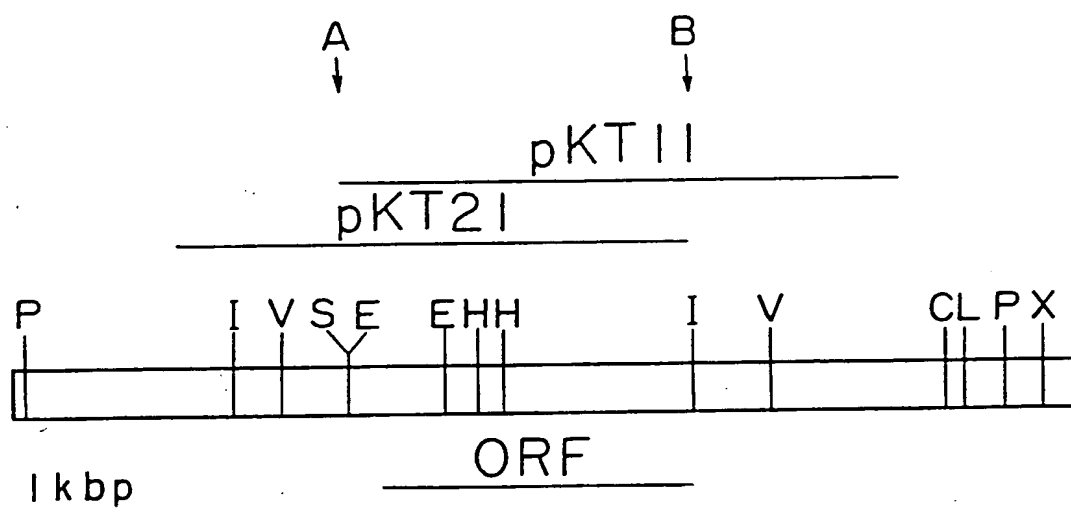


FIG. 25

26/44



P: Pst I	E: EcoR I
I: EcoT22 I	H: Hinc II
V: EcoRV	C: Sac I
S: Sph I	L: Sal I
	X: Xba I

FIG. 26

27/44

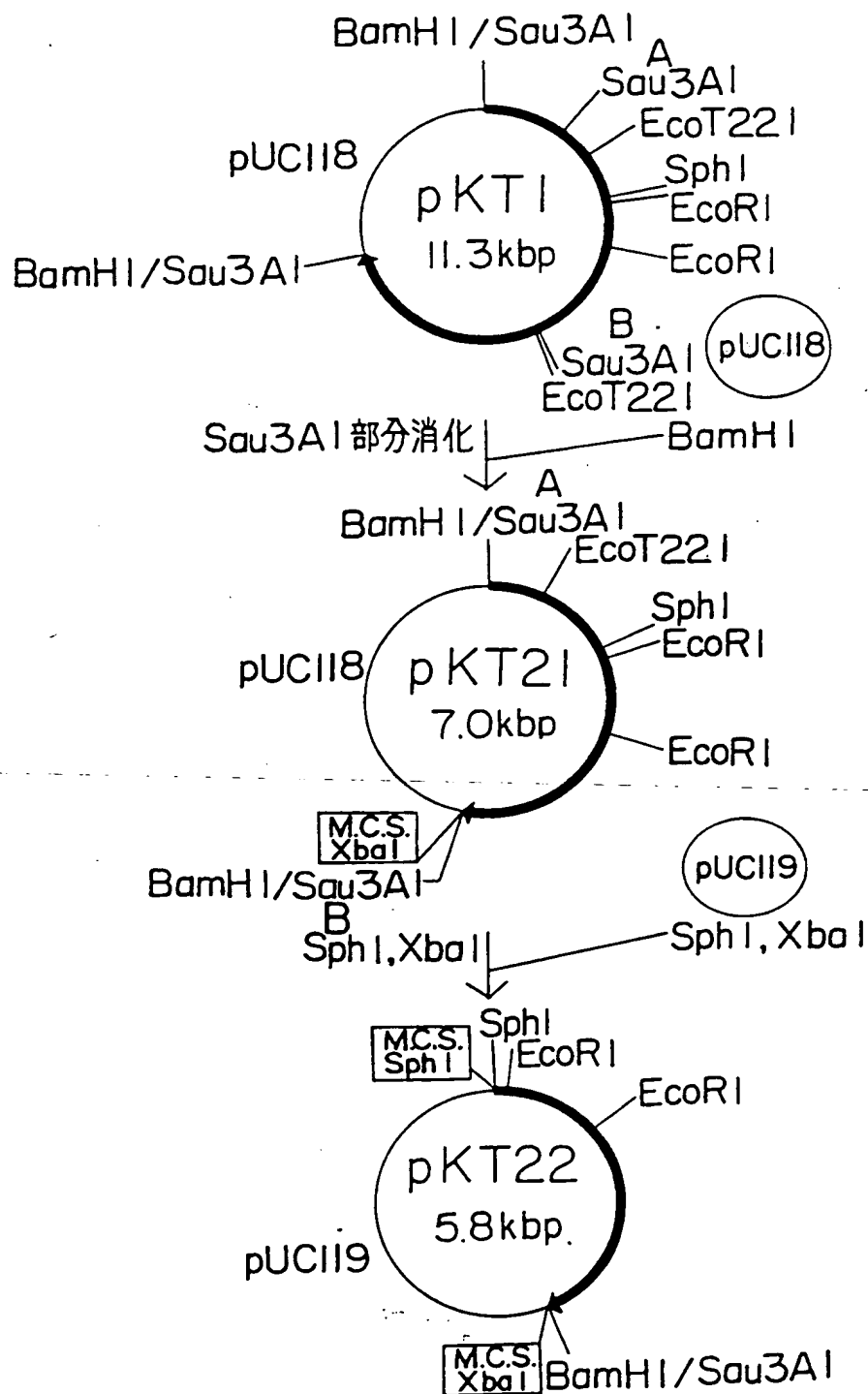
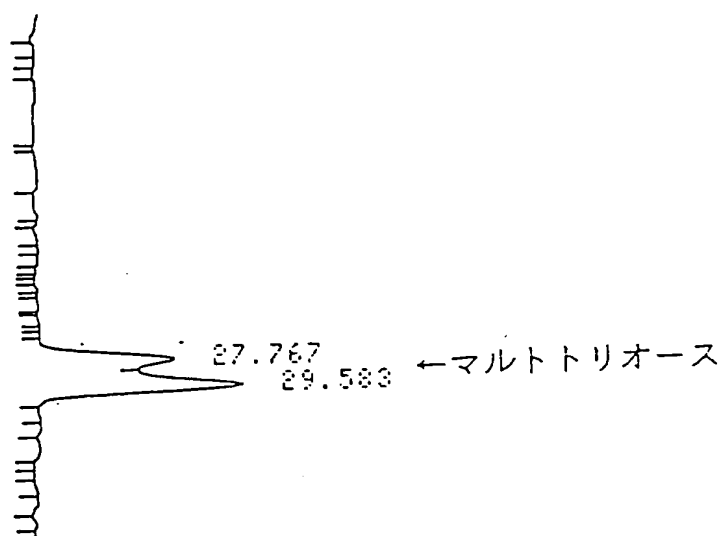


FIG. 27

28/44

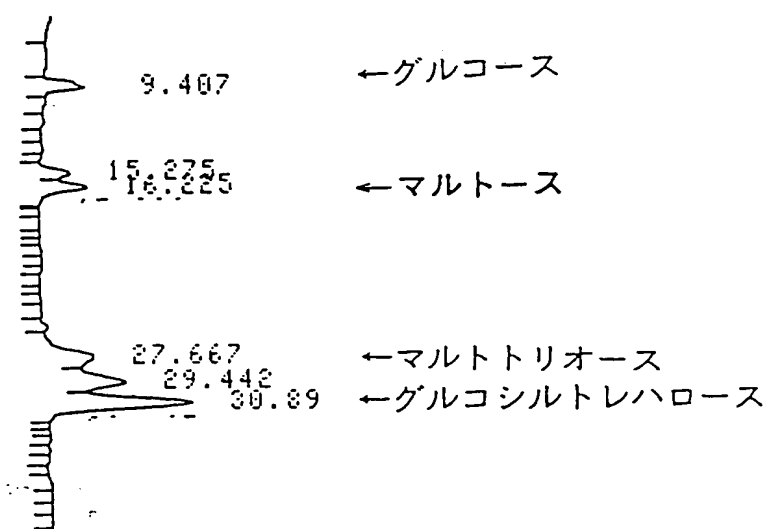
粗酵素添加前

FIG. 28A



粗酵素添加後

FIG. 28B



29/44

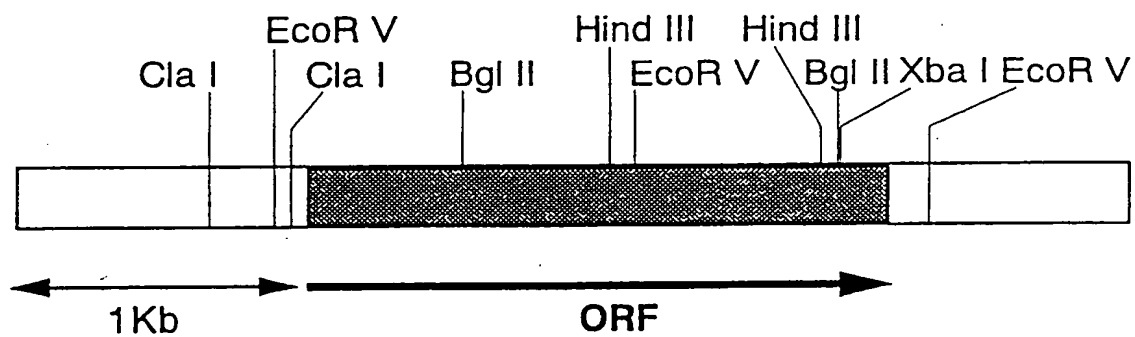
p09T1 挿入断片

FIG. 29

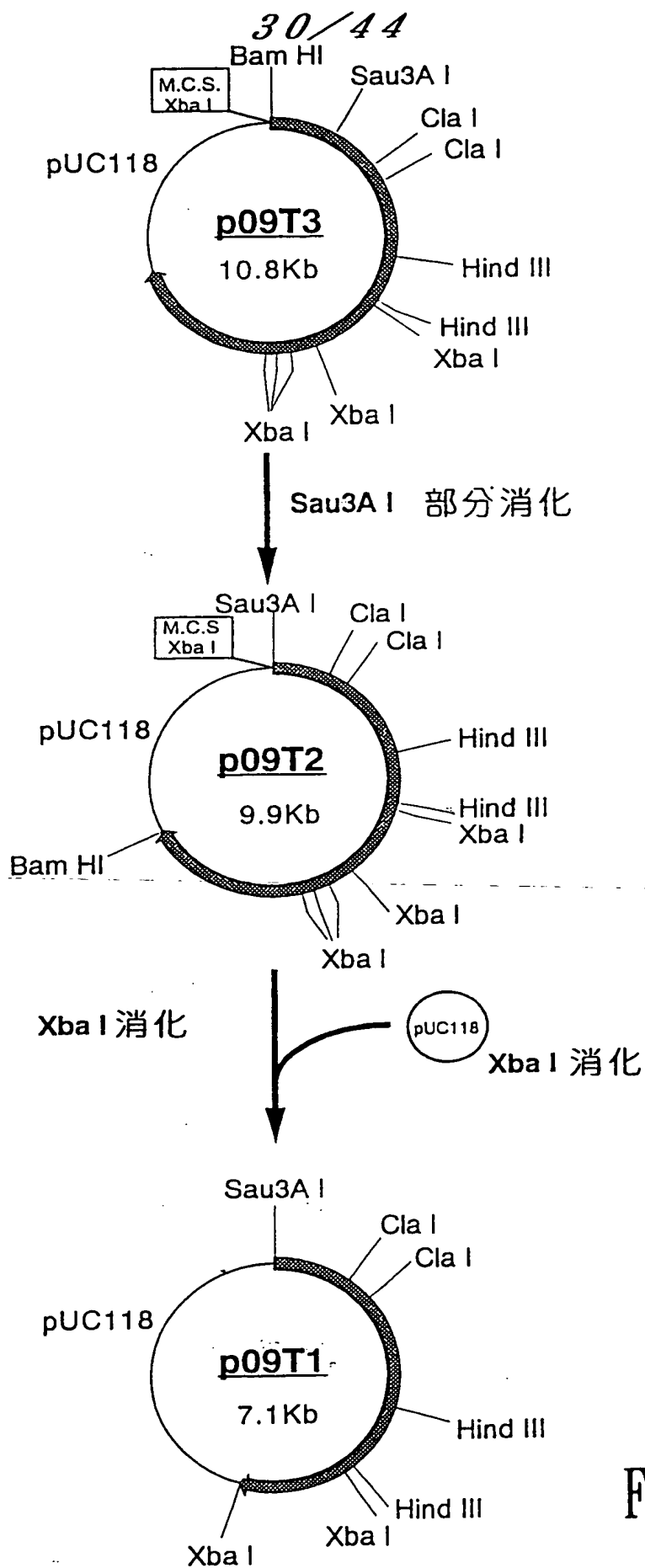


FIG. 30

31/44

```

1' MASPGSNHGYDVIDHSRIND
1" MIIGTYRLQLNKKFTFYDIENLDYFKELGVSHLYLSPILKARPGSTHGYDVVDHSEINE
21' ELGGEKEYRRLIETAHTIGLGIIQDIVPNHMAVNSLWRLMDVLKMGKSKYYTYDFFP
61" ELGGEEGCFKLVKEAKSRGLEIIQDIVPNHMAVHHTNWRLMDLLKSWKNSKYNYFDHY-
81' EDDKIRLPILGEDLDTVISKGLLKIVKDGDEY-----FLEYFKWKLPLTE---VG
120" DDDKIILPILEDELDTVIDKGLIKLQKDNIEYRGLILPINDEGVFLKRINCFDONSCLKK
128' NDIYDTLQKQNYTLMSWKNP-PSYRRFFDVNTLIGVNEKDHVFQESHKILDLDVDGYR
180" EDIKKLLLIQYYQLTYWKKGYPNYRRFFAVNDLIAVRVELDEVFRESHEIIAKLPVDGLR
187' IDHIDGLYDPEKYINDLRSII-KNKIIIVEKILGFQEELK--LNSDGTGYDFLNYSNLL
240" IDHIDGLYNPKEYLDKLRQLVGNKIIYVEKILSINEKL RDDWKVDGTTGYDFLNYNML
244' F--NFNQEIMDSIYENFTAEEKISISESIKKIKAQIIDELFSYEVKRLASQLGISYDILRD
300" LVDGSGEEELTKFYENFIGRKINIDELIIQSKKLVANQLFKGDIERLSKLLNVNYDYLDV
302' YLSCIDVYRTYANQIVKECDKNEIEEATK-RNPEAYTKLQQYMPAVYAKAYEDTFLFRY
360" FLACMKKYRTY--LPYEDINGIRECDKEGKLKDEKGIMRLQQYMPAIFAKGYEDTTLFIY
361' NRLISINEVGSDLRYYKISPDQFHVFNQKRRGKITLNATSTHDTKFSEDVRMKISVLSEF
418" NRLISLNEVGSDLRRFSLSIKDFHNFNLSRVNTISMNTLSTHDTKFSEDVRARISVLSEI
421' PEEWKKNVEEWHSIINPKVSRNDEYRYQVLVGSFYEGFSNDFKERIKQHMIKSVREAKI
478" PKEWEERVYIYHDLLRPNIDKNDEYRFYQTLVGS-YEGF--DNKERIKNHMIKVIREAKV
481' NTSWRNQKEYENRMELVEETFTNKDFIKSFMKFESKIRRIGMIKSLSLVALKIMSAGI
535" HTTWNPNIEYEKKVLGFIDEVFENSFRNDFENFEKKIVYFGYMKSLIATTLRFLSPGV
541' PDFYQGTEIWRYLLTDPDNRPVDFKKLHEILEKSKKFEKNMLESMDGRIKMYLTYKLL
595" PDIYQGTEVWRFLLTDPDNRPVDFKKLKELL---NNLTEKNLE-LSDPRVKMLYVKLL
601' SLRKQLAEDFLKGEYKGLDLEGLCGFIRFNKILVIAIKTGSVNYKLEEGAIYTDVLT
651" QLRR---EYSLNDYKLPF-----GFQR-GKVAVLFSPIVTREVKEKISIRQKSVDWIR
661' GEEIKK-EVQINELPRILVRM
701" NEEISSGEYNLSELIGKHKVVILTEKRE

```

FIG. 31

32/44

816' ATGGCTTCGCCAGGAAGTA-ACCATGGGTACGATGTAA
* * * * *
455" AAGGCTAGACCAGGGAGCACTCACGGCTACG--ATGTAGTAGATCAT-AGTGAAATTAAT
853' TAGATCATTCAAGGATAAACGATGAAC-TTGGAGGAG---AGAAAAGATACAGGAGATTA
* * * * *
512" GAGGAATTAGGAGGAGAAGAGGGGTGCTTTAACTAGTTAAGGAAGCTAAGAGTAGAGGT
909' ATAGAGACAGCTCATACTATTGGATTAGGTATTAT-ACAGGACATAGTACCAAAT-CACA
* * * * *
572" TTAGAAATCATAAAGATATAGTGCCAAATCATATGGCGGTACATCATACTAATTGGAGA
967' TGGCTGTAAATTCTCTA-AATTGG-CGACTAATGGATGTATTTAAATGGGTAAAAAGAG
* * * * *
632" CTTATGGATCTGTAAAGAGTTGGAAGAATAGTAAATACTATAACTATT-TTGATCACTA
1025' TAAATATTATACGTACTTTGACTTTTCCAGAGATGA-TAAGATACGATTACCCATAT
* * * * *
691" CGATGATGACAAGATAATCCTCCCAATACTTGAGGACGAGTTGGATACCGTT--ATAGAT
1084' TAGGAGAAGATTTAGATACAG--TGATAAGTAAAGGTTTATTAAGATAGTAAAAGATGG
* * * * *
749" AAGGGATTGATAAACTACAGAAGGATAATATAGAGTACAG-AGGGCTTATATTACCTAT
1142' AGATGAATATTTCTAGAATATTTCAAATGGA--AACT--TCCTCTAACAGAGGTTGGAA
* * * * *
808" AAATGATGAAGGAGTTGAATCTTGAAAAGGATTAATTGCTTTGATAATTCATGTTTAA
1198' ----ATGATATATACGCACCTTACAAAAACAGAATTATACCCTAATGTCTTGGA---
* * * * *
868" GAAAGAGGATATAAAGAAATTACTATTAATACAATATTATCAGCTAACTTACTGGAAGAA
1250' AAATCCTCCTAGCTATAGACGATTTCTCGATGTTAATACTTTAATAGGAGTAAATGTGCA
* * * * *
928" AGGTTATCCAACTATAGGAGATTTTTCGCAGTAAATGATTTGATAGCTGTTAGGGTAGA
1310' AAAAGATCAGTATTTCAAGAGTCCCATTCAAAGATCTTAGATTTAGATGTTGATGGCTA
* * * * *
988" ATFGGATGAAGTATTTAGAGAGTCCCATGAGATAATTGCTAAGCTACCAGTTGACGGTTT
1370' TAGAATTGATCATATTGATGGATTATATGATCCTGAGAAATATATTAATGACCT--GA-G
* * * * *
1048" AAGAATTGACCACATAGATGGACTATATAACCCTAAGGAGTATTTAGATAAGCTAAGACA
1427' GTCAATAATTAATAAATAAATAATTATTGTAGAAAAAATCTGGGATTTAGGAGGAATT
* * * * *
1108" GTTAGTAGGAAATGATAAGATAATATACGTAGAGAAGATATTGTCAATCAACGAGAAATT
1487' AA-----AATTAAATTCAGATGGAACCTACAGGATATGACTTCTTAAATTACTCCAATT
* * * * *
1168" AAGAGATGATTGGAAGTAGATGGGACTACTGGATATGATTTCTTGAACCTACGTTAATAT
1541' ACTGTT--TA-ATTTTAATCAAGA-GA-TAATGGAC-AGTATATATGAGAATTTACAGC
* * * * *
1228" GCTATTAGTAGATGGAAGTGGTGAGGAGGAGTTAACTAAGTTTTATGAGAATTTCAATTGG
1595' GGAGAAAATATCTATAAGTGAAAGTATAAAGAAAATAAAGCGCAATAATTGATGAGCT
* * * * *
1288" AAGGAAAATCAATATAGACGAGTTAATAATACAAAGTAAAAAATTAGTTGCAAAATCAGTT
1655' ATTTAGTTATGAAGTTAAAAAGATTAGCATCACAAGTGAATAGCTACGATATATTGAG
* * * * *
1348" ATTTAAAGGTGACATTGAAAAGATTAAGCAAGTTACTGAACGTTAATTACGAT-TATTTAG
1715' -AGATTACCTTTCTTGTATAGATGTGTACAGAACTTATGCTAATCAGAT-TGTAAGAGAG
* * * * *
1407" TAGATTTCTAGCATGTATGAAAAATACAGGACTTAT--TTACCATATGAGGATATTA

FIG. 32A

33/44

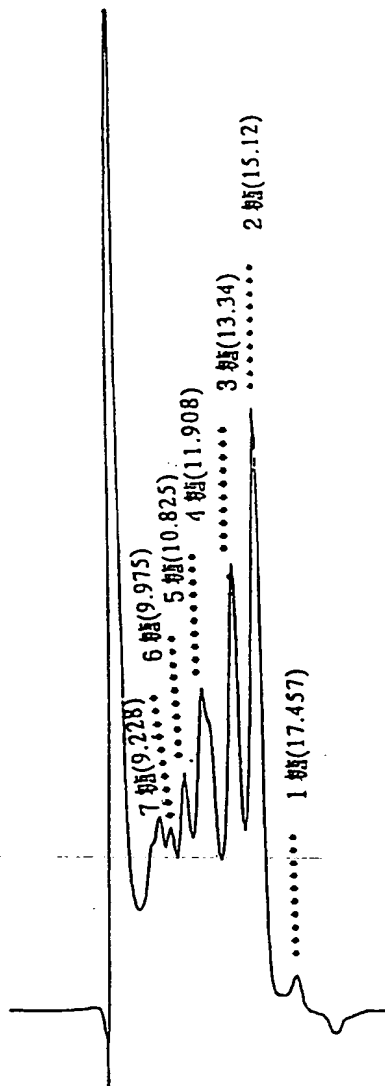
1773' TGTGATAAGACCAATGAGATAGAGGAAGCAACCAAAAGAAATCCAGAGGCTTATACTAAA
 1465" CGGAATAAG-GGAATGCGATA-AGGAGGGAAAGTTAAAAGATGAAAAGGGAATCATGAGA
 1833' TTACAACAATATATGCCAGCAGTATACGCTAAAGCTTATGAAGATACTTTCTCTTTAGA
 1523" CTCCAACAATACATGCCAGCAATCTTCGCTAAGGGCTATGAGGATACTACCTCTTCATC
 1893' TACAATAGATTAAATATCCATAAATGAGGTTGGAAGCGATTTACGATATTATAAGATATCG
 1583" TACAATAGATTAAATTTCCCTTAACGAGGTTGGGAGCGACCTAAGA-AGATTCAGTTTAAAG
 1953' CCT-GATCAGTTTCATGTATTTAATCAAAAACGAAGAGGAAAAATCACACTAAATGCCAC
 1642" CATCAAAGACTTTTATAAATTAACCTAAGCAGAGTAAATACCATATCAATGAACACTCT
 2012' TAGCACACATGATACTAAGTTTATGTAAGATGTAAGGATGAAAAAAGTGTATTAAAGTGA
 1702" TTCCAATCATGATACTAAATTCAGTGAAGACGTTAGAGCTAGAAATATCAGTACTATCTGA
 2072' ATTCCTGAAGAATGGAAAAATAAGGTCGAGGAATGGCATAGTATCATAAATCCAAAGGT
 1762" GATACCAAAGGAGTGGGAGGAGAGGGTAATATACTGGCATGATTTGTTAAGGCCAAATAT
 2132' ATCAAGAAATGATGAATATAGATATTATCAGGTTTTAGTGGGAAGTTTTATGAGGGATT
 1822" TGATAAAAAACGATGAGTATAGATTTTATCAAACACTTGTGGGAAG---TTACGAGGGATT
 2192' CTCTAATGATTTTAAGGAGAGAAATAAGCAACATATGATAAAAAAGTGCAGAGAAGCTAA
 1879" ---T--GATAATAAGGAGAGAAATTAAGAACCACATGATTAAGGTCATAAGAGAAGCTAA
 2252' GATAAATACCTCATGGAGAAATCAAAATAAGAAATATGAAAAAGAGTAATGGAATTAGT
 1933" GGTACATACAACGTGGGAAAAATCCTAATATAGAGTATGAAAAGAAGGTTCTGGGTTTCAT
 2312' GGAAGAAACTTTTACCAATAAGGATTTTATTAAAGTTTCATGAAATTTGAAAGTAAGAT
 1993" AGATGAAGTGTTTCGAGAACAGTAATTTTAGAAATGATTTTGAAATTTTGAAAGAAAAAT
 2372' AAGAAGGATAGGGATGATTAAGAGCTTATCCTTGGTCGCATTAAAAATTATGTCAGCCGG
 2053" AGTTTATTTTCGTTTATATGAAATCATTAATCGCAACGACACTTAGGTTCTTTTCGCCCCG
 2432' TATACCTGATTTTTATCAGGGAACAGAAATATGGCGATTTTACTTACAGATCCAGATAA
 2113" TGTACCAGATATTTATCAAGGAACTGAAGTTTGGAGATTCTTACTTACAGACCCAGATAA
 2492' CAGAGTCCCAGTGGATTTTAAGAAATTACACGAAATATTAGAAAAATCCAAAAATTTGA
 2173" CAGAAATGCCGGTGGATTTCAAGAACTAAAGGAATTATTAATAATTTGACTGAAAAGAA
 2552' AAAAAATATGTTAGAGTCTATGGAC--GATGGAAGA-ATTAAGATGTATTTAACATATAA
 2233" CTTAGAACTCTCAGATCCAAGAGTCAAAATGTTATATGTTAAGAAAT-TGCTACAGCTTA
 2609' GCTTTTATCCCTAAGAAAAACAGTTGGCTGAGGATTTTTTAAAGGGCGAGTATAAGGG---
 2292" GAAGAGAGTACTCACTAAACGATT--ATAAACCATTTGCCCTTTGGCTTCAAAGGGGAAA
 2656' ATTAGATCTAGAAGAAGGACTATGTGGGTTTA-TTAGGTTTAAACAAAATTTTGGTAATAA
 2350" AGTAGCTGTCCTTTTCTACCAATAGTGACTAGGGAGGTTAAAGAGAAAATTAGT-ATAA
 2725' TAAAAACCAAGGGGAAGTGTTAATTACAACTGAAACTTGAAGAGGGAGCAATTTACACAG
 2409" GGCAAA-AAAGCGTTGATTGGATCAGAAATGAGGAAATTAGTAGTGGAGAAT---ACAA
 2785' ATGTATTGACAGGAGAAGAAATTAAGAAAGGAGGTAAGGCTACCTAGGATAC
 2464" TTTAAGTGAGTTGATTGGGAAGCATAAAGTCGTTATA-TTAACTGAAAAAGGGAG

FIG. 32B

34/44

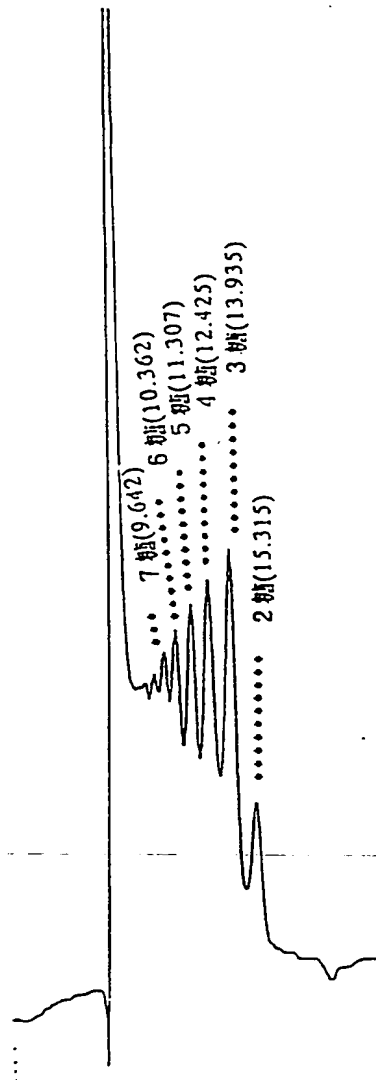
酵素存在下

FIG. 33A

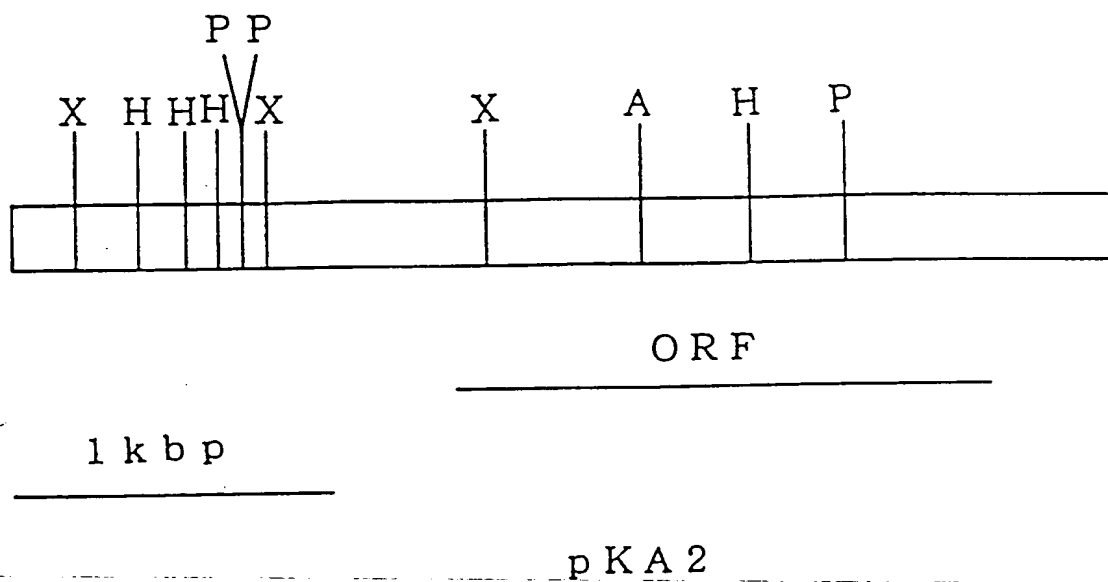


コントロール

FIG. 33B



35/44



A : A c c I
H : H i n c I I
P : P s t I
X : X b a I

FIG. 34

36/44

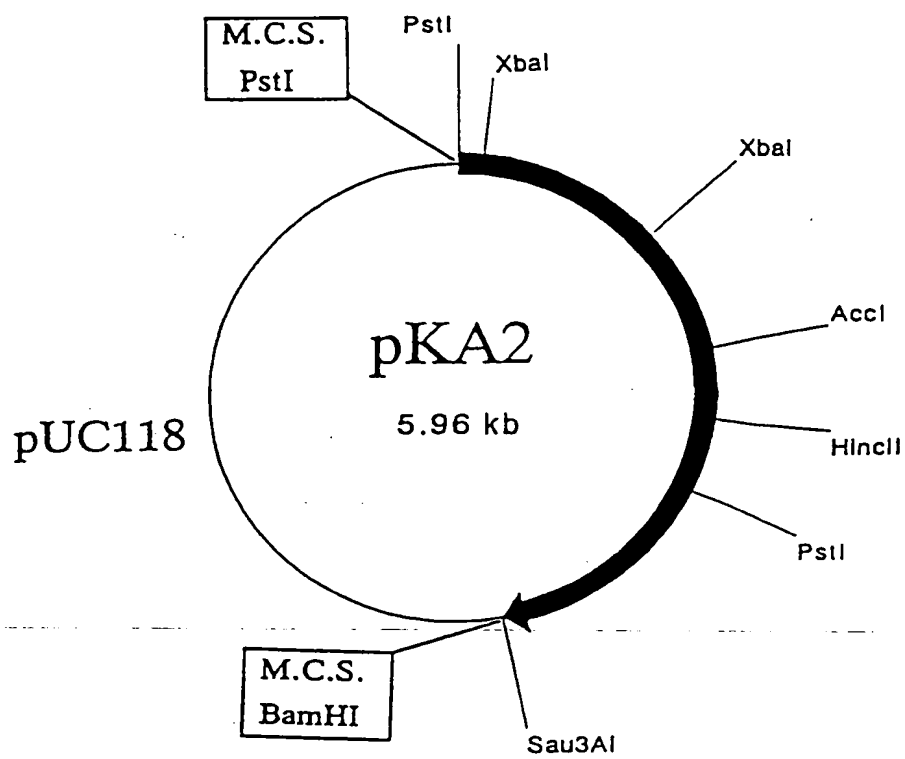


FIG. 35

37/44

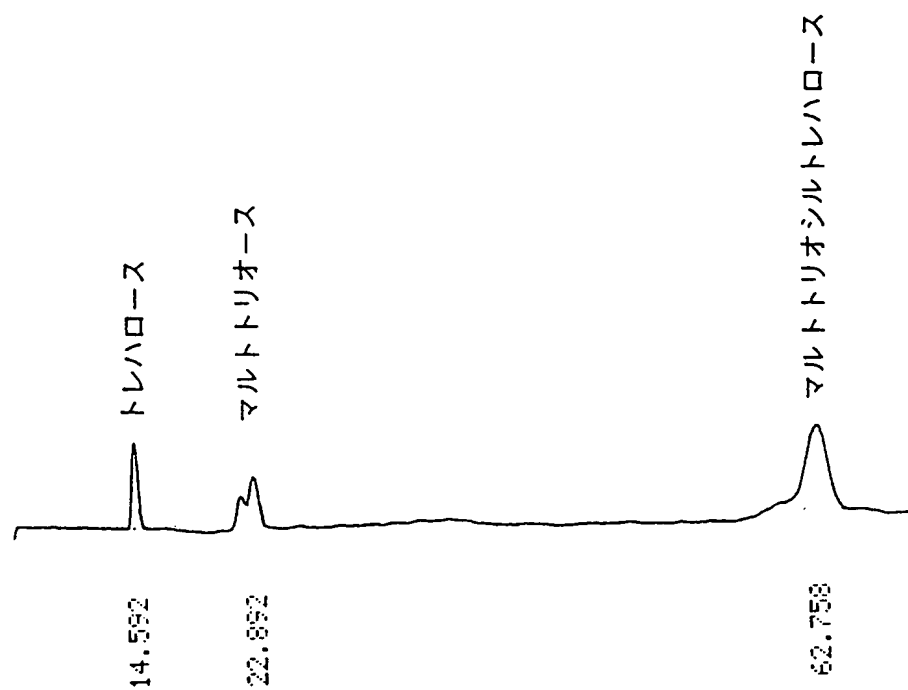


FIG. 36A

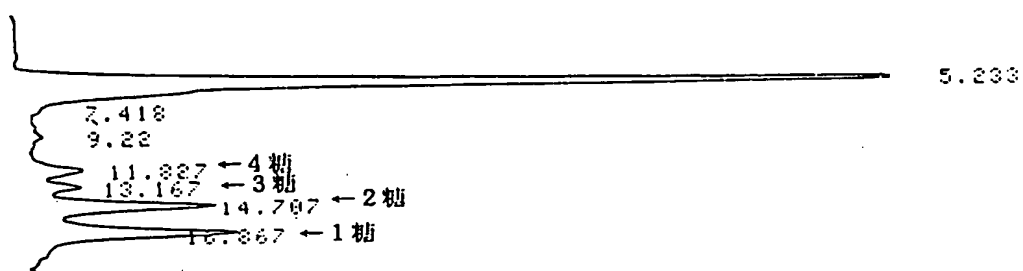


FIG. 36B

38/44

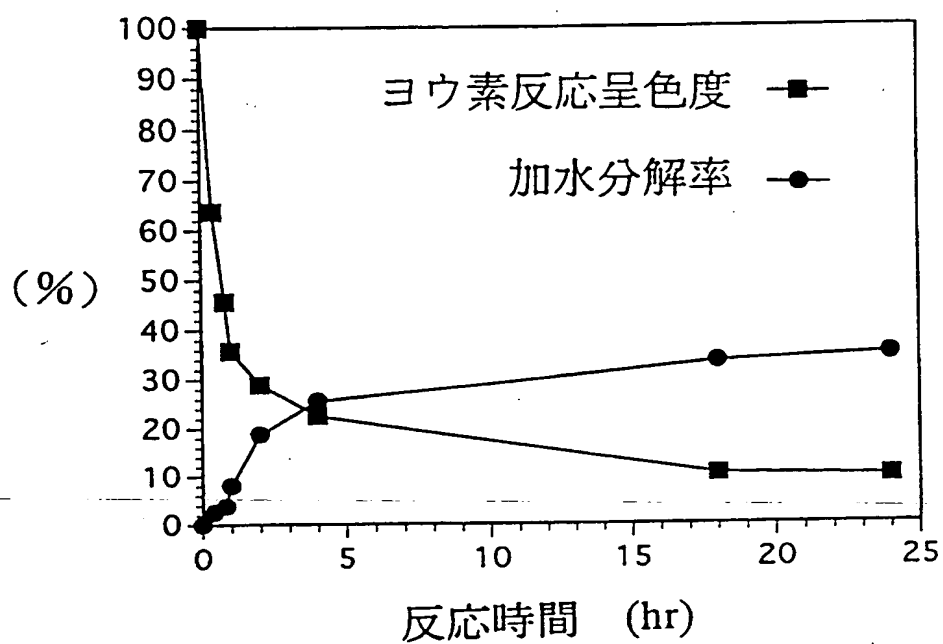


FIG. 37

39/44

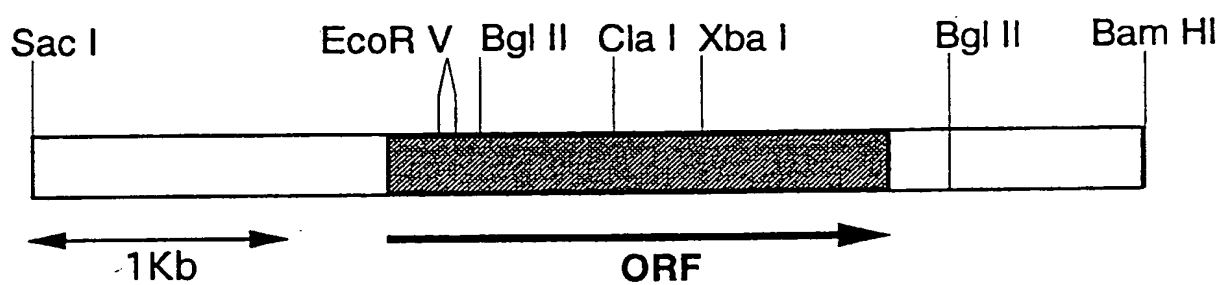
p09A1 挿入断片

FIG. 38

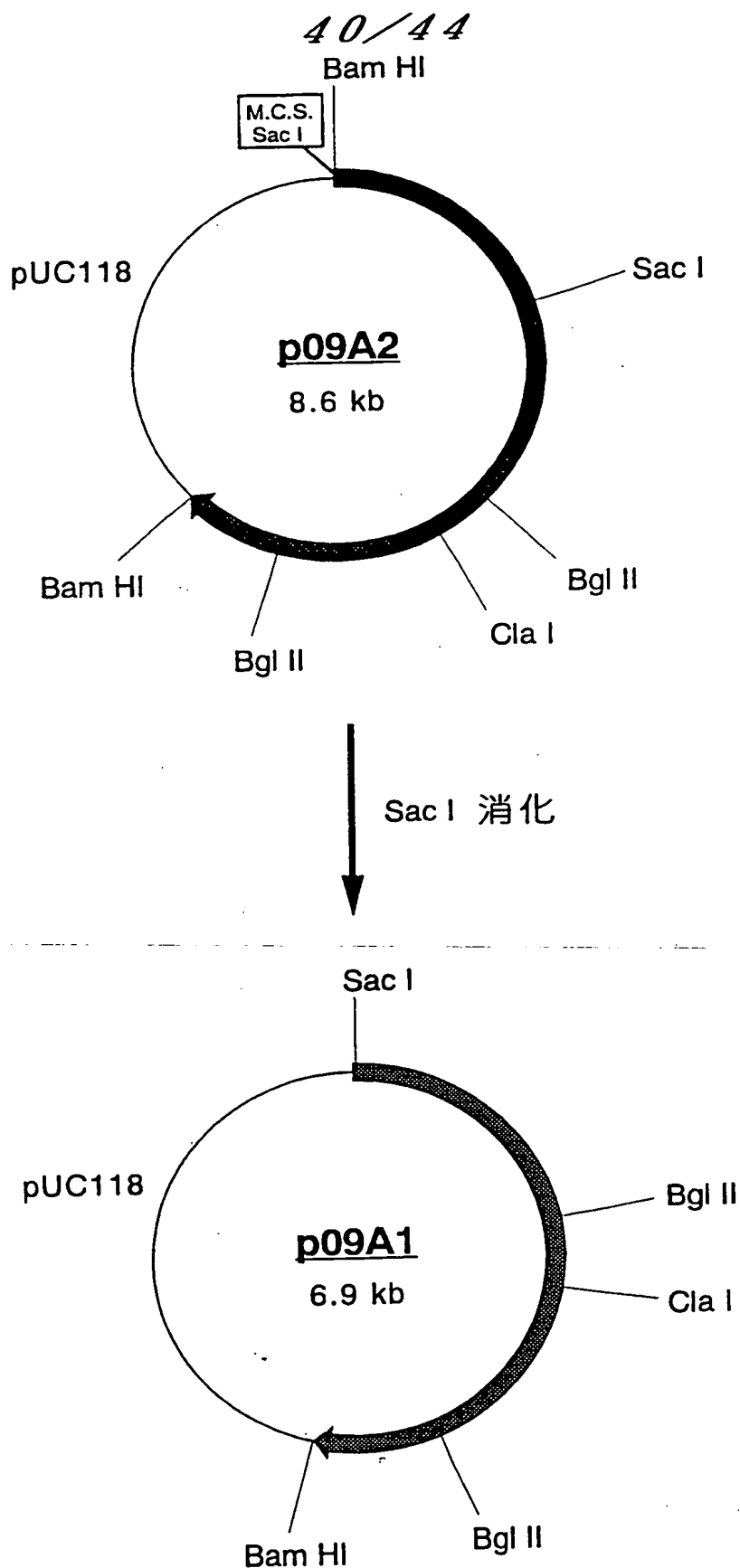


FIG. 39

41/44

1' MFSFGGNIENKNGIFKLWAPYVNSVKLK-LSKKLIPMEKNDEGFFEVEIDDIEENLTYSY
 1" TFAYKIDGNEVIFTLWAPYQKSVKLVLEKGLYEMERDEKGYFTITLNNVKVRDRYKY
 60' IIEDKREIPDPASRYQPLGVHDKSQLIRTDYQILDGKVKIEDLIIYELHVGTFQSQEGNF
 59" VLDDASEIPDPASRYQPEGVHGSPSQIIQESKEFNNETFLKKEDLIIYELHVGTFPTPEGTF
 120' KGVIEKLDYLDLKITGIELMPVAQFPGNRDWGYDGVFLYAVQNTYGGPWELAKLVNEAH
 119" EGVIRKLDYLDLGITAIEIMPIAQFPGKRDWGYDGVFLYAVQNSYGGPEGFRKLVDEAH
 180' KRGIAVILDVYVNHIGPEGNYLLGLGPYFSRDYKTPWGLTFNDDRGCDQVRKFILENVE
 179" KKGLGVILDVYVNHVGPEGNYMVKLGPYFSQYKTPWGLTFNDDAESDEVKFILENVE
 240' YWFKTFKIDGLRLDAVHAIFDNSPKHILQEIAEKAHQLGKFVIAESDLNDPKIV--KDDC
 239" YWIKYVNDGFRRLDAVHAIIDTSPKHILEEIAOVVHKYNRIVIAESDLNDPRVVPKEKC
 298' GYKIDAQWVDDFHAVHAFITKEKDYQDFGRIEDIEKTFKDVVYDGYKYSRYRGRTHG
 299" GYNIDAQWVDDFHHSIHAYLTGERQGYTDFGNLDDIVKSYKDVVYDGYKYSNFRKTHG
 358' APVGDLPPRKFFVFIQNHQVGNRGNGERLSILTDKTTYLMAATLYILSPYIPLIFMGEE
 359" EPVGELDGCNFVVIQNHQVGNRGKGERIILVDRESYKIAAALYLLSPYIPMIFMGEE
 418' YYETNPFFFFSDFSDPVLIGVREGRLKENNQ MIDPQSEEAFLKSKLSWKIDEEVLDDYK
 419" YGEENPFYFFSDFSDSKLIQGVREGRKKENGQDTPQDESTFNASKLSWKIDEEIFSFKY
 478' QLINIRKRYN-NCKRVKEVRREGNCITLIMEKIGIIASFDDIVINSKITGNLLIGI--GF
 479" ILIKMRKELSIACDRRVNVNGENWLIIGREYFSLYVFSKSSIEVKYSGTLLSSNNSF
 535' PKKLKKDELIKVNRRGVGVYQLE
 539" PQHIEEGK-YEFDKGFALYKL

FIG. 40

42/44

1176' ATGTTTTTCGTTCCGGTGGAATATTGAAAAAATAAAGGTATCTTTAAGTTATGGGCACCT
 642" ACGTTTGCTTATAAAATAGATGGAAATGAGGTAATCTTTACCTTATGGGCACCT
 1236' TATGTTAATAGTGTAAAGCTGAA-GTT--AAGCAAAAACTTATTCGAATGGAAAAAAC
 696" TATCAAAAGAGCGTTAAACTAAAGGTTCTAGAGAAGGGACTTTACGAAATGGAAAGAGAT
 1293' GATGAGGGATTTTTCGAAGTAGAAATAGACGATATCGAGGAAAAATTAACCTATTCTTAT
 756" GAAAAAGGTTACTTCACCATTACCTTAAACAACGTAAAGGTTAGAGATAGGTATAAATAC
 1353' ATTATAGAAGATAAGAGAGAGATACCTGATCCCGCATCACGATATCAACCTTTAGGAGTT
 816" GTTTTAGATGATGCTAGTGAAATACCAGATCCAGCATCCAGATACCAACCAGAAGGTGTA
 1413' CATGACAAATCACAACCTTATAAGAACAGATTATCAGATTCTTGACCTTGAAAAAGTAAAA
 876" CATGGGCCTTCACAATTATACAAGAAAGTAAAGAGTTCAACAACGAGACTTTTCTGAAG
 1473' ATAGAAGATCTAATAATATATGAACTCCACGTTGGTACTTTTTCCCAAGAAGGAAATTC
 936" AAAGAGGACTTGATAATTTATGAAATACACGTGGGGACTTTCACTCCAGAGGGAACGTTT
 1533' AAAGGAGTAATAGAAAAGTTAGATTACCTCAAGGATCTAGGAATCACAGGAATTGAACTG
 996" GAGGGAGTGATAAGGAAACTTGACTACTTAAAGGATTTGGAATTACGGCAATAGAGATA
 1593 ATGCCTGTGGCACAATTTCCAGGGAATAGAGATTGGGGATACGATGGTGTTTTCTATAC
 1056" ATGCCAATAGCTCAATTTCTGGGAAAAGGGATTGGGGTTATGATGGAGTTTATTATAT
 1653' GCAGTTCAAAATACTTATGGCGGACCATGGGAATTGGCTAAGCTAGTAAACGAGGCACAT
 1116" GCAGTACAGAACTCTTACGGAGGGCCAGAAGTTTTAGAAAGTTAGTTGATGAAGCGCAC
 1713' AAAAGGGGAATAGCCGTAATTTTGGATGTTGTATATAATCATATAGGTCCTGAGGGAAAT
 1176" AAGAAAGGTTTAGGAGTTATTTTAGACGTAGTATACAACCACGTTGGACCAGAGGGAAAC
 1773' TACCTTTTAGGATTAGGTCCTTATTTTTCAGACAGATATAAACTCCATGGGGATTAACA
 1236" TATATGGTTAAATTGGGGCCATATTTCTCACAGAAATACAAAACGCCATGGGGATTAACC
 1833' TTTAATTTTGATGATAGGGGATGTGATCAAGTTAGAAAATTCATTTTAGAAAATGTCGAG
 1296" TTTAATTTTGACGATGCTGAAAGCGATGAGGTTAGGAAGTTTCATCTTAGAAAACGTTGAG
 1893' TATTGGTTTAAAGACCTTTAAATCGATGGTCTGAGACTGGATGCAGTTTCATGCAATTTT
 1356" TACTGGATTAAGGAATATAACGTTGATGGGTTTAGATTAGATGCGGTTTCATGCAATTATT
 1953' GATAATTCGCCTAAGCATATCCTCCAAGAGATAGCTGAAAAAGCCCATCAATTAGGAAAA
 1416" GACACTTCTCCTAAGCACATCTTGGAGGAAATAGCTGACGTTGTGCATAAGTATAATAGG
 2013' TTTGTTATTGCTGAAAGTGATTTAAATGATCCAAAAATAG-TAA-----AAGATGATTGT
 1476" ATGTGCATAGCCGAAAGTGATTTAAACGATCCTAGAGTCGTTAATCCCAAGGAAAAGTGT
 2067' GGATATAAAATAGATGCTCAATGGGTTGACGATTTCCACCACGCAGTTTCATGCATTCATA
 1536" GGATATAATATTGATGCTCAATGGGTTGACGATTTCCATCATTCTATTACGCTTACTTA
 2127' ACAAAGAAAAAGATTATTATTACCAGGATTTTGGAAAGGATAGAGATATAGAGAAAACT
 1596" ACTGGTGAGAGGCAAGGCTATTATACGGATTTTCGGTAACCTTGACGATATAGTTAAATCG

FIG. 41A

43/44

2187' TTAAAGATGTTTTGTTTATGATGGAAAGTATTCTAGATACAGAGGAAGAACTCATGGT
* * * * *
1656" TATAAGGACGTTTTCGTATATGATGGTAAGTACTCCAATTTTGAAGAAAACTCACGGA
2247' GCTCCTGTAGGTGATCTTCCACCACGTAAATTTGTAGTCTTCATACAAAATCACGATCAA
* * * * *
1716" GAACCAAGTTGGTGAAGTAGACGGATGCAATTTTCGTAGTTTATATACAAAATCACGATCAA
2307' GTAGGAAATAGAGGAAATGGGGAAAGACTTTCCATATTAACCGATAAAACGCATACCTT
* * * * *
1776" GTCGAAATAGAGGCAAAGGTGAAAGAATAATTAAATTAGTCGATAGGGAAAGCTACAAG
2367' ATGGCAGCCACACTATATATACTCTCACCGTATATACCGCTAATATTTATGGGCGAGGAA
* * * * *
1836" ATCGCTGCAGCCCTTTACCTTCTTTCCCTATATTCCAATGATTTTCATGGGAGAGGAA
2427' TATTATGAGACGAATCCTTTTTTCTTCTCTGATTTCTCAGATCCCGTATTAATTAAG
* * * * *
1896" TACGGTGAGGAAATCCCTTTTATTTCTTTCTGATTTTTCAGATTCAAAATGATACAA
2487' GGTGTTAGAGAAGGTAGACTAAAGGAAATAATCAAATGATAGATCCACAATCTGAGGAA
* * * * *
1956" GGTGTAAGGGAAGGGAGAAAAAGGAAACGGGCAAGATACTGACCTCAAGATGAATCA
2547' GCGTTCCTAAAGAGT--AACTTTTCATGGAAAATTGATGAGGAAGTTTTAGATTATTATA
* * * * *
2016" AC--TTTAAACGCTTCCAACTGAGTTGGAGATTGACGAGGAAATCTTTTCATTTTACA
2605' AACAACTGATAAATATCAGAAA-GAGAT-ATAATA-ATTGTAAGGGTAAAGGAAGTTA
* * * * *
2074" AGATTTTAATAAAAAATGAGAAAGGAGTTGAGCATAGCGTGTGATAGGAGAGTAAACGTCTG
2662' GGAGAGAAGGGAAGTATTACTTTGATCATGGAAAAATAGGAATAATTGCATCGTTTG
* * * * *
2134" TGAATGGCGAAAATTGGTTGATCATCAAGG-GAAGAGAATACTTTTCACTCTACGTTTTT
2722' ATGATATTGT-AATTAATTCTAAAATTACAGGTAATTTACTTATAGGCATAGGATTTCCG
* * * * *
2193" TCTAAATCATCTATTGAAGTTAAGTACAGTGGAACCTTTACTTTTGTCTCAAATAATTCA
2781' AAAAAATTGAAAAAAGATGAA--TTAAT-TAAGGTAAACAGAGGTGTTGGGGTATATCAA
* * * * *
2253" TTCCCTCAGCATATTGAAGAAGGTAAATATGAGTTTGATAAGGGATTTGCTTTATATAAA
2838' TTAGAA
*
2313" CTT

FIG. 41B

44/44

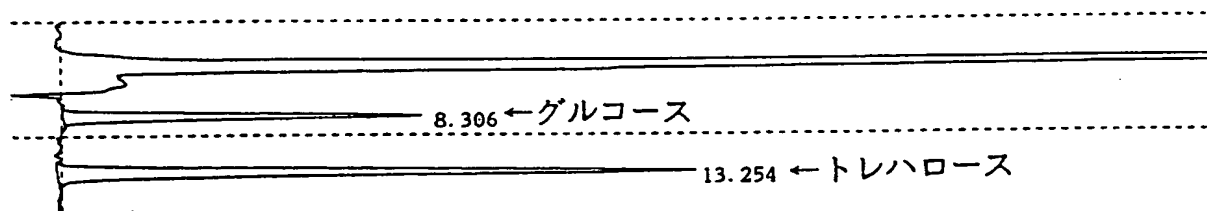


FIG. 42